

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND. PHARM.

Strukturstudie av humant erythropoietin (hEPO)

**Påvisning av fosfatgrupper på erythropoietin
fra human urin**



av Marianne Lea

Kjemisk seksjon, Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo
Høsten 2006

Forord

Denne hovedfagsoppgaven ble utført ved Dopingseksjonen, Hormonlaboratoriet, Aker Universitetssykehus i perioden november 2005 til november 2006, under veiledning av Gro Nissen-Lie og Peter Hemmersbach.

Under hele prosessen har jeg fått god veiledning og oppfølging, helt fra planleggingen av lab-arbeidet til fullføring av oppgaveskrivingen. Jeg vil takke alle som har lagt forholdene til rette for meg og gjort denne oppgaven mulig å gjennomføre.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Gro Nissen-Lie for hennes gode humør og iver, som virkelig smitter. Tusen takk for all hjelp underveis og under skriveprosessen.

Diskusjonsmøtene vi har hatt med Venke Skibeli har dessuten vært veldig nyttige. Jeg vil også takke Mette Borgen for uvurderlig hjelp på labben, samt hyggelige samtaler. Takk til alle ved dopingseksjonen som har latt meg bli en del av et hyggelig arbeidsmiljø. Jeg vil dessuten takke Peter Hemmersbach som er viktig en del av dette inspirerende miljøet.

Takk til kjæreste, familie og venner for støtte og forståelse i en travel tid.

Oslo, 02.11.06

Marianne Lea

Sammendrag

Erythropoietin fra human urin ble oppkonsentrert ved hjelp av ultrasentrifugering og karakterisert ved hjelp av SDS-PAGE, IEF og 2D elektroforese. 2D elektroforese separerer proteinene med hensyn på størrelse og ladning i samme system.

2D-systemet ble optimalisert med hensyn på IPG-stripsenes pH-intervall, behandlingen av stripsene, påsatt mengde erythropoietin og elektroblottingen. Det ble laget et detaljert krysseskjema for at ulike operatører skal kunne utføre metoden på likest mulig måte.

Ved 2D elektroforese ble det bekreftet at uhEPO har en rekke negative ladninger som ikke er tilstede på det rekombinante hormonet. Ved hjelp av trinnvis deglykosylering av uhEPO var målet å bestemme hvilke monosakkarider negativt ladde grupper er koblet til. Det ble vist at galaktoseenheter innefor sialinsyrener har negativt ladde grupper påkoblet, mens β -D-N-acetylglukosamin ikke ble vist å ha det. Ved sammenlikning av totalt deglykosylert uhEPO og rhEPO ble det konkludert med at negativt ladde grupper også er tilknyttet uhEPOs proteinkjede.

Fosforylering direkte i gel viste at uhEPO er fosforylert. Human urin inneholder dessuten et ukjent fosforylert protein med størrelse liknende uhEPO, men med noe mer basisk pI. Det ble ikke påvist at shEPO er fosforylert, noe som kan tyde på at fosforyleringen som detekteres på uhEPO har fungert som en "merkelapp" for utskillelse via nyrene i urinen.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	6
1.1	DOPING I IDRETTE	6
1.1.1	Historie	6
1.1.2	Hva er ulovlig?	7
1.2	ERYTROPOIETIN	8
1.2.1	Kjemisk struktur	11
1.2.2	Glykosyleringsmønster	12
1.2.3	Terapeutisk bruk	15
1.2.4	Misbruk av erythropoietin i idretten	16
2	Hensikt med oppgaven	18
3	Materialer og metoder	19
3.1	OPPKONSENTRERING AV PROTEINER I URIN VED ULTRASENTRIFUGERING	19
3.1.1	Prinsipp	19
3.1.2	Prosedyre	19
3.2	IMMUNOMAGNETISK EKSTRAKSJON	20
3.2.1	Prinsipp	20
3.2.2	Prosedyre	20
3.3	SDS-POLYAKRYLAMID GELELEKTROFORESE	20
3.3.1	Prinsipp	20
3.3.2	Prøveopparbeidelse	22
3.3.3	Prosedyre	22
3.4	ISOELEKTRISK FOKUSERING (IEF)	23
3.4.1	Prinsipp	23
3.4.2	Prøveopparbeidelse	23
3.4.3	Prosedyre	24
3.5	TODIMENSJONAL (2D) ELEKTROFORESE	24
3.5.1	Prinsipp	24
3.5.2	Prosedyre	25
3.6	ELEKTROBLOTTING	27
3.6.1	Prinsipp	27
3.6.2	Prosedyre	27
3.7	IMMUNODETEKSJON	28
3.7.1	Prinsipp	28
3.7.2	Prosedyre	31
3.8	FARGING AV FOSFATGRUPPER I GEL	32
3.8.1	Prinsipp	32
3.8.2	Prosedyre	32
3.9	DEGLYKOSYLERING AV HUMANT ERYTROPOIETIN	33
3.9.1	Enzymatisk spalting av N-bundet sukker	33
3.9.2	Enzymatisk spalting av sialinsyrer fra N- og O-bundet sukker	34
3.9.3	Enzymatisk spalting av O-bundet sukker	34
3.9.4	Enzymatisk spalting av β -D-galaktose (Gal)	35
3.9.5	Enzymatisk spalting av β -D-N-acetylglukosamin (GlcNAc)	35
3.9.6	Enzymatisk spalting av fosfatgrupper	35
3.9.7	Kjemisk spalting av O-bundet sukker	36
4	Resultater	37
4.1	METODEUTVIKLING AV 2D ELEKTROFORESE FOR ERYTROPOIETIN ...	37

4.1.1	Optimalisering av systemet	38
4.2	KARAKTERISERING AV HUMANT ERYTROPOIETIN	44
4.2.1	Deglykosylering av humant erythropoietin og analyse på SDS-PAGE	44
4.2.2	Lokalisering av ukjente negative ladninger på human urin erythropoietin.....	47
4.2.3	Metoder for påvisning av fosfatgrupper	51
5	Diskusjon.....	58
5.1	HVOR PÅ ERYTROPOIETINMOLEKYLET ER LADNINGENE BUNDET? ...	58
5.2	HVILKE GRUPPER GIR DE NEGATIVE LADNINGENE PÅ HUMAN URIN ERYTROPOIETIN?.....	63
6	Konklusjon	68
7	Referanseliste	69
8	Vedlegg	75
	Vedlegg 1 Forkortelser og definisjoner.....	76
	Vedlegg 2 Reagenser, apparatur og oppskrifter	78

1 Innledning

1.1 DOPING I IDRETTE

1.1.1 Historie

Doping i idretten er ikke noe nytt fenomen. Prestasjonsøkende soppekstrakter ble brukt av greske idrettsutøvere allerede i antikkens Hellas. ”*Ma Huang*” med efedrin som aktiv substans, ble brukt av idrettsutøvere i Kina for over fem tusen år siden [1]. Efedrin er nå klassifisert som dopingmiddel på grunn av sin stimulerende effekt.

Ettersom farmasøytisk industri kom til ble tilgangen på mulige dopingmidler større. Stimulerende midler var det de fleste idrettsutøverne brukte for å øke prestasjonsevnen, til å begynne med. Disse stoffene kan assosieres med plutselige kollaps eller død på grunn av respirasjonsdepresjon eller hjertestans. De har også langtidsbivirkninger som avhengighet og toleranse. Allmennheten ble godt kjent med omfanget av doping blant idrettsmenn etter to dødsfall på 1960-tallet. På åpningsdagen av OL i Roma i 1960 døde syklisten Knud Jensen etter bruk av det stimulerende middelet amfetamin. I 1967 var tv-seere verden over vitne til Tommy Simpsons død i Tour de France. Ved obduksjon ble det funnet spor av amfetamin, metamfetamin og konjakk i kroppen hans [2].

Disse to tragiske hendelsene bidro sterkt til at idretten begynte sin kamp mot dopingbruk. Dopingkontrollene ble innført på slutten av 1960-tallet, og systematiske dopingtester ble for første gang gjennomført ved OL i München i 1972 (stimulerende midler) [1]. I Norge ble Hormonlaboratoriet ved Aker Universitetssykehus akkreditert av IOC (Den Internasjonale Olympiske Komité) som Norges dopinglaboratorium i 1988. Etter at dopingkontrollene begynte å avsløre misbruk av kroppsfrremmede (eksogene) stoffer som ikke finnes naturlig i kroppen, for eksempel amfetamin og efedrin, er det blitt vanligere med misbruk av kroppsegne (endogene) stoffer som testosteron og erythropoietin (EPO) [3]. Dette har gitt doping-jegerene nye utfordringer, da påvisning av et stoff i urinen ikke lenger er godt nok bevis for at utøveren har dopet seg.

1.1.2 Hva er ulovlig?

WADA (World Anti Doping Agency) leder dopingkontrollene internasjonalt og Anti-Doping Norge har ansvaret for dopingarbeidet på nasjonalt plan. WADAs dopingliste beskriver hvilke stoffer og metoder som er forbudt å bruke både i og utenfor konkurranse. Stoffer eller metoder som vurderes for inklusjon er de som oppfyller minst to av tre kriterier:

- 1) Har potensial til å øke idrettsprestasjoner
- 2) Har reell eller potensiell helserisiko
- 3) Bryter med god sportsånd [3].

Blant gruppene på listen er anabole steroider (for eksempel testosteron og nandrolon), hormoner (for eksempel erythropoietin (EPO), veksthormon (GH) og insulin), stimulerende midler (for eksempel amfetamin og efedrin) og narkotiske stoffer (for eksempel morfin og petidin). Det er heller ikke lov å innta stoffer som maskerer bruk av dopingmidler (for eksempel diuretika og probenecid). Alle som er registrert i et idrettslag i Norge må følge Norges idrettsforbund og Olympiske komités (NIF) regler om doping. NIFs lov, kapittel 12, regulerer dopingbestemmelsene [4].

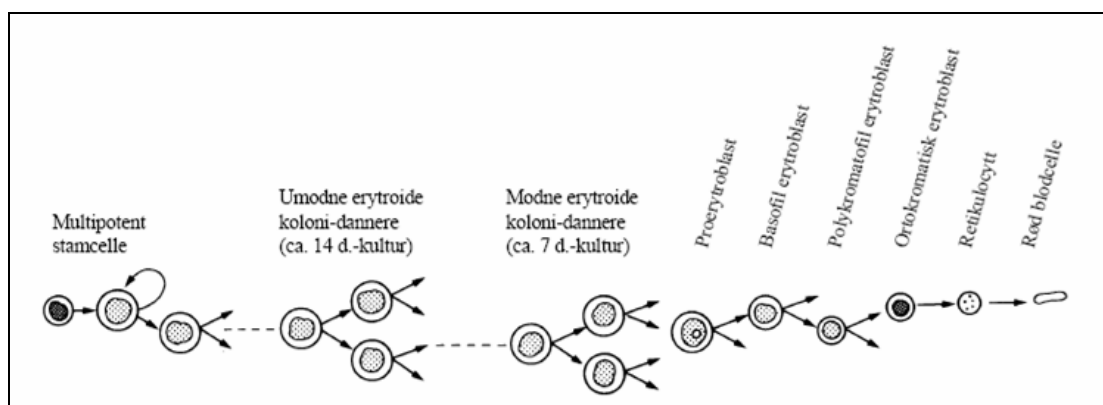
Tabell 1.1: Forhold som anses som regelbrudd på dopingbestemmelsene (NIF).

- | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">• Tilstedeværelsen av et forbudt stoff eller spor av dette i utøvers dopingprøve.• Bruk eller forsøk på bruk av et stoff eller metode som er forbudt i hht. særskilt dopingliste fastsatt av WADA.• Å unnlate å møte til pålagt dopingkontroll, nekte å avgi dopingprøve eller å unndra seg dopingkontroll på annen måte.• Å bryte retningslinjer om utøverinformasjon eller ikke være tilgjengelig for dopingkontroll i henhold til retningslinjene.• Å forfalske, forbytte eller å ødelegge en dopingprøve.• Å besitte stoff som i henhold til dopinglisten er forbudt ved dopingkontroll utenfor konkurranse eller besitte forbudt metode.• Å tilvirke, innføre, utføre, selge, distribuere, erverve, sende eller overdra et forbudt middel eller en forbudt metode.• Å foreskrive eller gi et forbudt middel eller metode eller forsøk på dette. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

1.2 ERYTHROPOIETIN

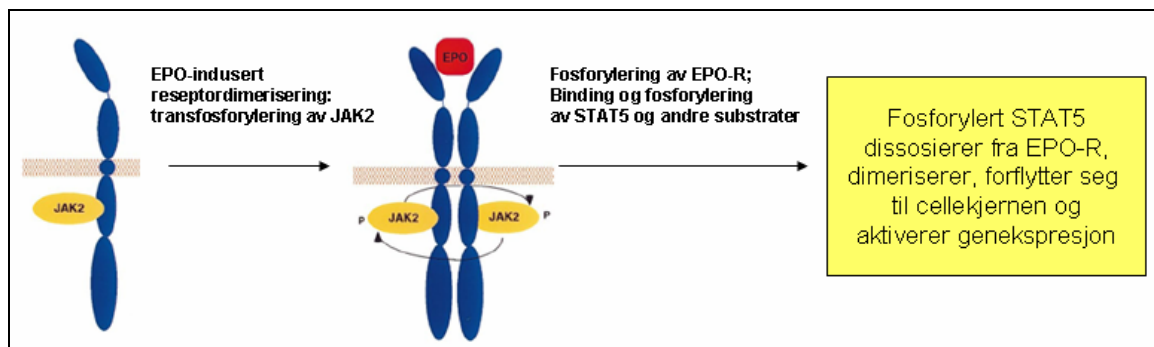
Erythropoietin (EPO) er et glykoprotein som hovedsakelig produseres i nyrene [5]. Hormonet er et av cytokinene som regulerer dannelsen av blodceller (hematopoiesen). Andre cytokiner som deltar er blant annet kolonistimulerende faktorer (CSF), interleukiner og tumor nekrosefaktorer [6]. Erythropoietins hovedoppgave er å stimulere produksjonen av røde blodceller i benmargen (erytropoiesen) [7]. Erytrocyttene møter organismens oksygenkrav ved å transportere oksygen fra lungene til perifere vev [8].

Hematopoietiske stamceller er umodne celler som kan utvikles til å bli en av de mange celletypene som finnes i blodet; erytro-, leuko- eller trombocytter. Stamcellene kan også fornye seg selv ved å dele seg. Progenitorceller er etterkommere av stamcellene. Disse kan dele seg og gi opphav til celler som igjen kan dele seg mange ganger før de er blitt så modne at de har mistet celledelingsevnen. Progenitorcellene kan ikke fornye seg selv. Disse umodne cellene er avhengige av vekstfaktorene (cytokinene) som er nevnt over for å dele seg og utvikles til modne blodceller [6]. Erythropoietin virker på sene stadier i utviklingen av erytroide progenitorceller. EPOs primære oppgave er å redde erytroide celler fra apoptose for å forlenge deres overlevelse i sirkulasjonen [9]. I tillegg stimulerer EPO erytroide progenitorceller til å gå inn i celledyklus [10], samt fører til en økning i retikulocytfrigjøring fra benmargen [6]. Retikulocytter er forløpere til erytrocytter og inneholder rester av ribosomer. Etter ett til to døgn i sirkulasjonen er disse restene borte og cellen regnes som en moden erytrocytt [11].



Figur 1.1: Oversikt over erytropoiesen [6]. Utviklingen fra proerytroblaststadiet begynner med en celledelingsperiode på 3-4 døgn før celledelingsevnen tapes (ca polykromatofil erytroblast). Etter videre modning i et par døgn trer retikulocytten ut i sirkulasjonen og utvikles til en moden erytrocytt i løpet av ett til to døgn.

Erythropoietin binder seg til reseptorer på overflaten av erytroide progenitorceller [9]. EPO-reseptoren er et transmembrant glykoprotein i cytokinreseptor superfamilien [12]. EPO bindes til to reseptormolekyler som dimeriserer og aktiverer to Janus kinase 2 (JAK2)-tyrosin kinaser (Figur 1.2). Disse fosforylerer tyrosin på EPO-reseptorene og på andre proteiner. Fosforylert tyrosin på EPO-reseptoren fungerer som bindingssete for signalmolekyler som inneholder SH2-domener. Som et resultat av dette aktiveres ulike signaltransduksjonsveier, inkludert STAT5, PI3-K, Ras og protein tyrosin fosfataser. Signalveiene fører til aktivering av gener som stimulerer erytroide celler til deling og differensiering til modne erytrocytter [13].

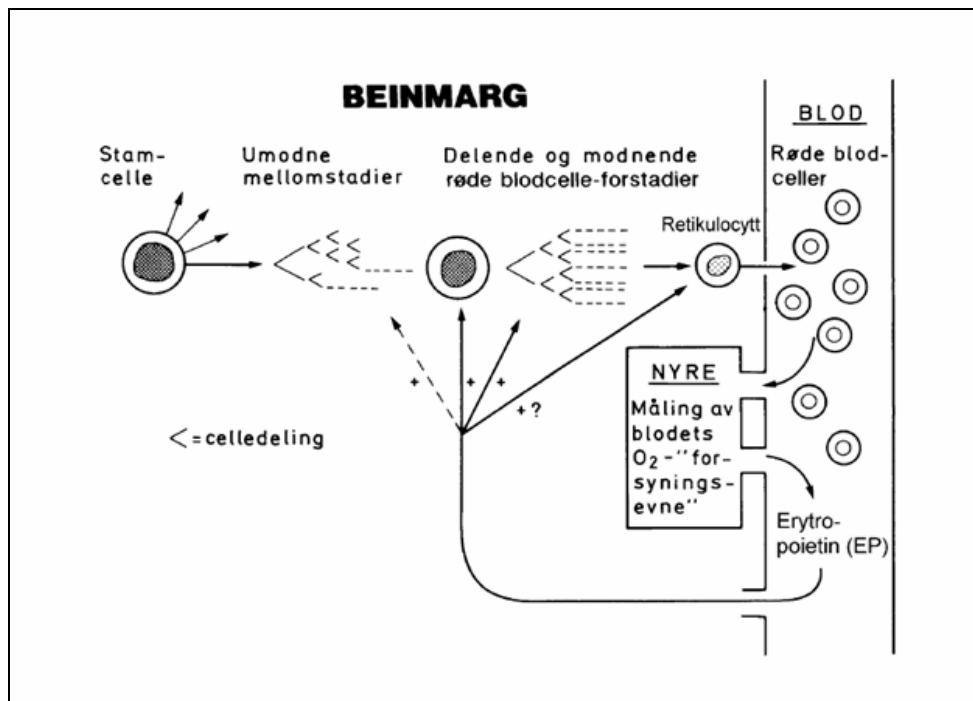


Figur 1.2: Generell oversikt over erythropoietins aktivering av EPO-reseptoren (EPO-R). Binding av EPO fører til en dimerisering av reseptorene og en aktivering av Janus kinase 2 (JAK2). JAK2 fosforylerer tyrosingrupper på EPO-R og disse fungerer som bindingssteder for ulike signalmolekyler inkludert STAT5. Signalmolekylene fører til aktivering av gener som stimulerer erytroide celler til deling og differensiering til modne erytrocytter [13].

Erythropoietin produseres i endotelceller i de peritubulære cellene i nyrevevet hos voksne [9]. Hos fosteret produseres EPO i leverceller, men kort tid etter fødselen overtar nyrene som hovedproduksjonssted [5]. Erytrocytter mangler cellekjerne, mitokondrier og andre celleorganeller, de er "små poser" fylt med O₂-bindende hemoglobinmolekyler. Siden erytrocyttene mangler DNA og RNA som kan reparere celledskader har de en gjennomsnittlig levetid i sirkulasjonen på kun 120 dager. Dette gir at 3 millioner erytrocytter dør per sekund. På grunn av et nesten konstant antall erytrocytter i sirkulasjonen nydannes ca like mange per sekund. Hos voksne mennesker er normalt nivå erytrocytter 5 millioner per µl [11].

Det primære stimuli for produksjon av erythropoietin er vevshypoksi [5], det vil si at O₂-forsyningen begrenser O₂-opptaket i vevene [14]. Genet som koder for EPO ligger på kromosom 7 og transkripsjonen av dette genet kontrolleres av *hypoxia-inducible factor 1α* (HIF-1α). Transkripsjonsfaktoren aktiveres ved nedsatt oksygenkonsentrasjon i cellene og aktiverer så genet for EPO [15]. Oksygensensoren er muligens et hemeprotein som endrer konformasjon ved binding av oksygen til hemegruppen [16]. Cellene som kontrollerer

syntesen av EPO responderer på endringer i blodets O_2 -kapasitet og -affinitet samt partialtrykket til oksygen. I tillegg kan hastigheten på lokal blodgjennomstrømning og cellulært O_2 -forbruk ha noe å si [5]. Ved opphold høyt over havet eller i høydehus hvor O_2 -trykket i luften er lavt, vil O_2 -trykket i lungealveolene synke og lite O_2 leveres til cellene i kroppen. Lavt oksygeninnhold i blodet gjør at erythropoietin-sekresjonen tiltar og fører til et økt erythrocyttantall. Dette danner det fysiologiske grunnlaget for høydetrening [11]. Blødning vil også føre til et lavt O_2 -innhold i blodet og resultere i en økt erythropoietin-sekresjon. Opphold i store høyder vil kunne gi en overproduksjon av EPO som antakelig er den viktigste patogene faktoren i utviklingen av kronisk høydesyke. Tilstanden øker risikoen for hjerteinfarkt og slag [17].

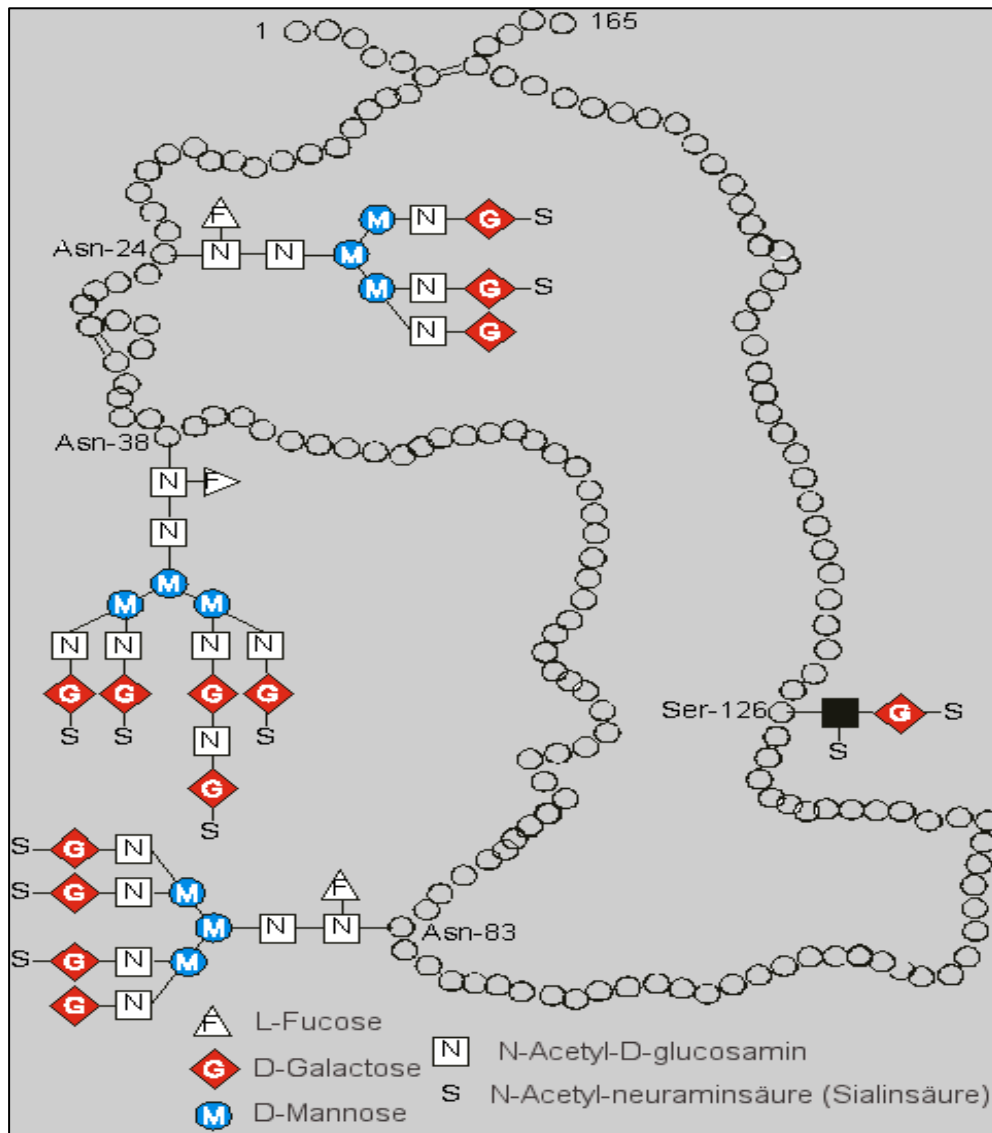


Figur 1.3: Oversikt over reguleringen av erytropoiesen [6].

I 1977 isolerte Miyake *et al.* rensed erythropoietin fra human urin for første gang [18]. Dette førte til at Lin *et al.* og Jacobs *et al.* i 1985 klonet genet for humant EPO og utviklet en transfektert cellelinje i CHO (chinese hamster ovary)-celler. Humant EPO (hEPO) var dermed den første hematopoietiske vekstfaktoren til å bli klonet [19, 20]. Med rekombinant humant EPO (rhEPO) tilgjengelig startet utviklingen av rhEPO-terapi for anemipasienter. Etter at rhEPO ble tilgjengelig som et farmasøytisk preparat i 1988 [21], økte dessuten risikoen for illegal bruk i idretten [22].

1.2.1 Kjemisk struktur

EPO er et glykoprotein som består av 165 aminosyrer og 4 karbohydratsidekjeder [23]. EPO er tungt glykosylert og sukkeret utgjør ca 40 % av den totale molekylvekten. Varierende glykosyleringsmønster gjør at molekylvekten varierer, men den ligger et sted mellom 30 og 34 kDa [24]. Molekylvekten til polypeptidkjeden alene er ca 18 kDa. Det er den glykosylerte formen av EPO som er den biologisk aktive formen *in vivo* [25].



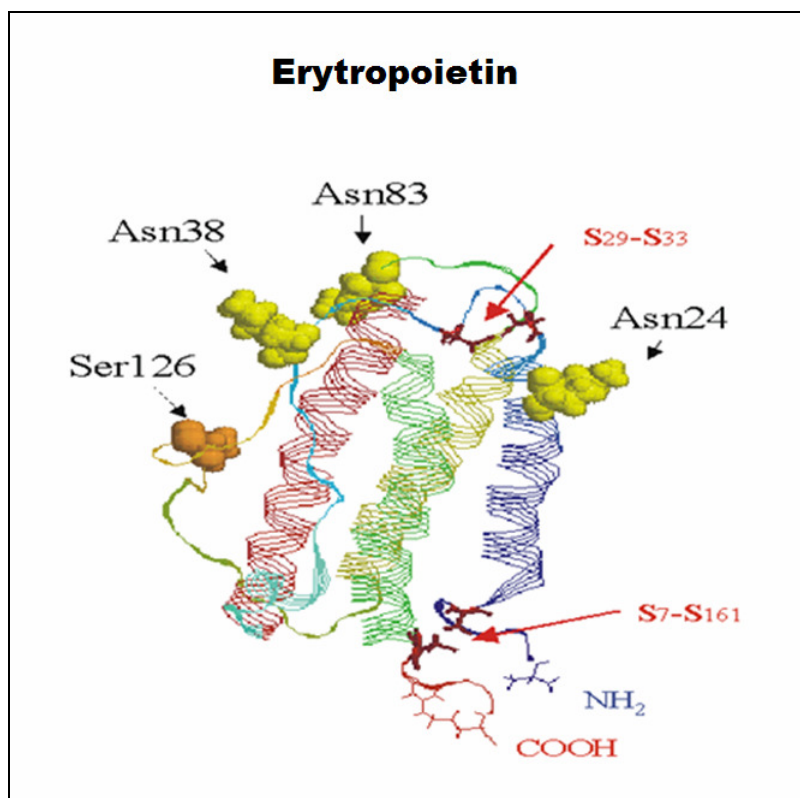
Figur 1.4: Primærstrukturen til erythropoietin. Asn: Asparagin. Ser: Serin. Erythropoietin har tre N-bundne sukkere til asparagin i 24-, 38- og 83-posisjon, i tillegg til ett O-bundet sukker til serin 126. Disulfidbroer sees fra cystein 7 til cystein 161 og fra cystein 29 til cystein 33.

Humant EPO inneholder intramolekylære disulfidbroer to steder i molekylet, mellom cystein 7 og 161 og mellom cystein 29 og 33 (Figur 1.4). Reduserer man disulfidbroene, mister EPO

sin biologiske aktivitet *in vivo* [24], men broen mellom cystein 7 og cystein 161 er absolutt viktigst for den biologiske aktiviteten [26].

Tre av karbohydratsidekjedene på EPO er knyttet til aminosyren asparagin via en N-glykosidbinding (N-glykosylering). I tillegg har hormonet en liten karbohydratkjede knyttet via en O-glykosidbinding til aminosyren serin (O-glykosylering) [27].

Erythropoietinmolekylets tredimensjonale struktur er en bunt med fire α -helikser foldet i en kompakt struktur (Figur 1.5).



Figur 1.5: Erythropoietins tredimensjonale struktur består av fire α -helikser. Asn: Asparagin. Ser: Serin.

1.2.2 Glykosyleringsmønster

En av de mest vanlige modifiseringene av eukaryote proteiner er glykosylering. Ferdig syntetiserte proteiner tas opp i endoplasmatisk retikulum (ER) og får oligosakkaridstrukturer påheftet her. Selv om alle proteinene i en celle utsettes for det samme glykosyleringsmaskineriet i ER, resulterer den videre modifisering av sukkerstrukturene i Golgi-apparatet til en mikroheterogenitet [28]. Modulering av glykoproteinet halveringstid eller å føre til gjenkjenning (eventuelt maskering) av celler eller mikroorganismer, er mulige hensikter med denne modifisering [29]. Monosakkarider kan kombineres på en rekke ulike

måter og gi opphav til oligosakkarider med ulike lengder og sekvenser. Dessuten kan anomeriteten (α eller β) varieres i bindinger og forgreningspunkter. I tillegg kan påheking av andre grupper som sulfat-, fosfat-, acetyl eller metylgrupper på sukkerkjedene gi enda flere variasjonsmuligheter. Resultatet er at et glykoprotein foreligger som en blanding av glykoformer med lik proteinkjede, men ulik struktur og/eller disposisjon på sukkerkjedene. Glykoformene har blitt vist å være celle-, arts-, polypeptid- og setespesifikke [30]. Et glykoprotein har dermed en reproducerbar og karakteristisk glykosyleringsprofil eller glykosyleringsmønster [27, 31].

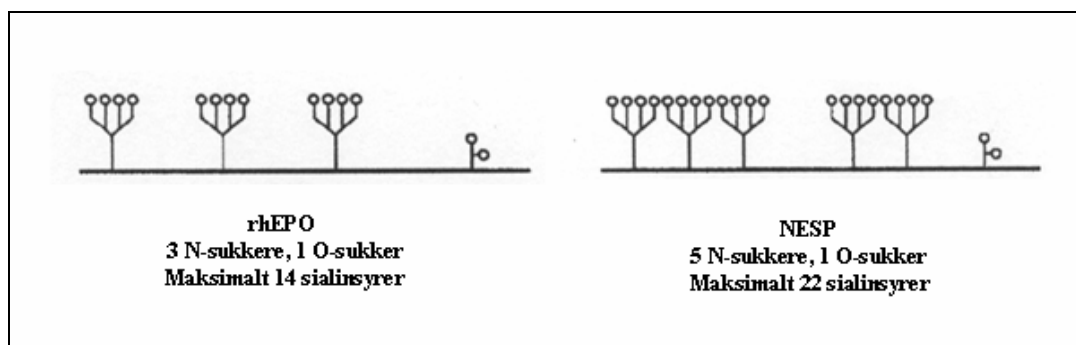
Glykoproteiner hos pattedyr har N-glykaner bygget opp av en fast kjerne bestående av to N-acetylglukosamin (GlcNAc) og tre mannose-enheter. Vanlige forlengelser av denne kjernen gir opphav til tre hovedtyper N-glykaner; a) oligomannosestrukturer (2-6 mannoser i tillegg til kjernen), b) komplekse strukturer (to eller flere forgreninger (antennar) som inneholder minst én GlcNAc, galaktose eller sialinsyre) og c) hybrid type (én forgrening med komplekse og én forgrening med oligomannosestrukturer). Komplekse glykaner eksisterer i bi-, tri- og tetraantennære former, ofte med terminale sialinsyrer [27, 32]. Disse formene, som sees hos EPO, er et viktig bidrag til mikroheterogeniteten både med hensyn på størrelse og ladning. Med unntak av sialinsyrene er alle sukkermolekylene på EPO uten ladning [33]. For human urin EPO er generelt de samme forgreningsmønstrene hos de N-koblede sukkerene tilstede som for det rekombinante hormonet, men de relative mengdene av de individuelle strukturene varierer. Human urin erythropoietin (uhEPO) har et noe lavere innhold av tetraantennære former enn rhEPO [34], og humant serum erythropoietin (shEPO) inneholder ikke tetrasialiserte former i det hele tatt [31]. Det er også vist at glykosyleringen av EPO kan være endret ved sykdom og ulike fysiologiske tilstander hos samme individ [35]. Det O-bundne sukkeret er totalt ulikt for uhEPO og rhEPO [36], men dette er ikke vist å utgjøre noen stor forskjell med hensyn på biologisk aktivitet.

Rekombinant og naturlig EPO har identisk aminosyresekvens og identisk posisjon for de to disulfidbindingene og de fire glykosyleringssetene. Grunnet produksjon i ulike celletyper er det forskjeller i glykosyleringsmønsteret mellom rhEPO og endogent EPO. Dette kan være forklaringen på at den biologiske aktiviteten *in vivo* er lavere for rensset uhEPO (70 000 IE/mg peptid) enn for rensset rhEPO (200 000 IE/mg peptid) [17]. En IE (internasjonal enhet) EPO er definert som mengden EPO som produserer den samme erythropoiese-stimulerende effekten som 5 μ mol koboltklorid [37]. Forskjellen i sukkersammensetningen hos naturlig og

rekombinant hormon er bakgrunnen for metoden som brukes for deteksjon av rhEPO i urin i dag [7].

Proteinkjeden til EPO er ansvarlig for hormonets reseptorbinding som fører til stimulering av erythropoiesen [38]. *In vitro* har deglykosylert EPO større effekt enn den glykosylerte formen. Deglykosylert EPO har likevel tilnærmet ingen effekt *in vivo* [39]. Sukkerkjedene er altså viktige for opprettholdelse av den biologiske aktiviteten *in vivo* [38, 40] og tapet av aktivitet er proporsjonalt med mengden karbohydrat som fjernes fra molekylet. Årsaken til dette er ikke økt reseptorbinding, men at sialinsyrer ytterst på sukkerkjedene forhindrer rask EPO-eliminering fra kroppen [39]. Det terminale monosakkaridet på N-bundne sukkerer er vanligvis sialinsyre bundet til galaktose [41], dermed er galaktose det terminale sukkermolekylet når sialinsyrene er spaltet av (Figur 3.7). Galaktose-bindende protein i leverceller er antakelig involvert i utskillelsen av desialisert erythropoietin. Fukuda *et al.* viste at desialisert rhEPO ble skilt ut i urinen innen ti minutter [25], mens intakt rhEPO har en halveringstid på 4-7 timer [42]. Sialinsyrer fører altså til nedsatt affinitet for EPO-reseptoren, men en lenger serum-halveringstid, som ser ut til å være det avgjørende for biologisk aktivitet.

EPO inneholder opptil fjorten sialinsyrer per molekyl, fire på hvert N-bundet sukker (N-sukker) og to på det O-bundne sukkeret (O-sukkeret) [41]. NESP (new erythropoiesis-stimulating protein), eller Darboepoietin α , er en glykosyleringsanalog av erythropoietin som er laget ved å endre fem aminosyrer i polypeptidet for introduksjon av to nye N-sukkerer [22]. Resultatet er et glykoprotein med fem N-sukkerer, ett O-sukker og maksimalt tjueto sialinsyrer (Figur 1.6). Sialinsyrene gir NESP en tredoblet halveringstid i forhold til EPO [43], noe som gir NESP den kliniske fordelene med sjeldnere dosering.



Figur 1.6: Skjematiske fremstillinger av oligosakkaridene på EPO (erythropoietin) i forhold til NESP (new erythropoiesis-stimulating protein eller darboepoietin) [33].

EPO fra human urin er surere enn EPO fra humant serum og rekombinant EPO [41, 44].

Sialinsyrene er ofte bakgrunnen for ladningsforskjeller, men for disse formene er maksimalt antall sialinsyrer det samme. Siden rhEPO i tillegg antas å være sialisert i større grad enn endogent EPO [31, 41], må andre strukturelle ulikheter være årsaken til forskjellene.

Fosforylering og sulfatering er mulige opphav til de ekstra negative ladningene på uhEPO [41].

1.2.3 Terapeutisk bruk

Rekombinant erythropoietin benyttes i behandlingen av pasienter med kroniske nyrelidelser og symptomatisk hos AIDS-pasienter med zidovudin-indusert anemi og kreftpasienter med nedsatt hematopoiese i benmargen. Legemiddelet kan også brukes i forbindelse med kirurgiske inngrep for å redusere bruken av blodtransfusjoner som er forbundet med risikoer som immunreaksjoner, infeksjoner og overdose av jern. Rekombinant erythropoietin øker hematokrit og hemoglobinkonsentrasjonen doseavhengig og forutsigbart [17]. rhEPO gis ved subkutan eller intravenøs injeksjon. Startdosen er mellom 50 og 150 IE/kg tre ganger ukentlig og dosen titreres så etter behov for å oppnå ønsket hemoglobinnivå [42].

Bivirkningene er få og sjeldent alvorlige siden rhEPO er så likt det naturlig forekommende hormonet. Det er vanlig å oppleve influensaliknende symptomer som hodepine, svimmelhet, tretthet og leddsmarter ved oppstart av behandlingen [42]. Doseavhengig hypertensjon eller forverring av hypertensjon sees på som en av de mest alvorlige bivirkningene. Det er kun nyresviktpasienter som opplever denne bivirkningen [45]. rhEPO-behandling kan føre til jernmangel. Det er derfor viktig å monitorere pasienters jernlagre, for deretter å gi et tilskudd av jern om nødvendig [46].

Nesten alle pasienter med kroniske nyrelidelser lider av anemi, en tilstand hvor blodets kapasitet til å transportere oksygen er redusert. Dette skyldes først og fremst at nyrene ikke lenger klarer å produsere normale mengder erythropoietin, noe som gir et lavt innhold av erythrocytter i blodet. Rundt 25 % av nyrepasientene på dialyse måtte jevnlig ha transfusjon/tilførsel av røde blodceller før rhEPO ble tilgjengelig som legemiddel. I dag er rhEPO et av de mest solgte farmasøytiske preparater [37]. Generelle symptomer på anemi er tretthet, hodepine, øresus, svimmelhet, kuldefølelse, redusert fysisk yteevne og hjertebank [47]. rhEPO-injeksjoner bidrar til å øke livskvaliteten hos anemiske pasienter ved å redusere disse symptomene. En svært sjelden, men alvorlig bivirkning hos nyresviktpasienter som

behandles med rhEPO er total benmargssvikt (pure red cell aplasia). Tilstanden skyldes en immunrespons som fører til dannelsen av antistoffer mot erythropoietin. Antistoffene nøytraliserer både endogent og rekombinant EPO og fører til en mer alvorlig anemi [48].

Ved maligne sykdommer forekommer ofte anemi. Flere faktorer bidrar til dette; økt produksjon av erythropoiesehemmende cytokiner, cancerbehandlingen samt av og til infiltrasjon av cancerceller i benmargen. Både behandling med blodtransfusjoner og erythropoietin benyttes. Rundt 60 % har effekt av behandling med erythropoietin. Ved langvarige behandlingskrevende anemier foretrekkes EPO-behandling fremfor gjentatte transfusjoner [49].

På grunn av sin noe lengre halveringstid og dermed større aktivitet *in vivo* injiseres NESP vanligvis en gang ukentlig eller annenhver uke i motsetning til rhEPO som gis 2-3 ganger i uken [42]. Dette utgjør en stor klinisk fordel for anemipasienter ved at de kan møte opp sjeldnere for å få en injeksjon og likevel oppnå samme biologiske respons som ved bruk av rhEPO.

1.2.4 Misbruk av erythropoietin i idretten

Aerobe utholdenhetsaktiviteter begrenses av oksygenleveringen til musklene i arbeid [50]. Ved å stimulere erythropoiesen fører erythropoietin til et økt antall erythrocytter i blodet. Dette gir en økt hemoglobinkonsentrasjon og fører til et forbedret maksimalt oksygenopptak (VO_{2max}) [51]. Det er vist at rhEPO-administrasjon gir en forlenget tid til utmattelse ved løping på tredemølle [52] og ved sykling på ergometersykel [53]. Ekblom og Berglund viste i 1991 at bruken av rhEPO hos friske individer førte til en tilsvarende økning i maksimalt oksygenopptak som ved transfusjon av røde blodceller [52]. Idrettsutøvere som langdistanseløpere, -skiløpere og -syklister får fordeler med hensyn på utholdenhet ved bruk av erythropoietin [54].

Den Internasjonale Olympiske Komité (IOC) forbød bruken av rhEPO i idrett i 1990 selv om det da ikke fantes metoder for deteksjon av hormonet verken i blod eller urin [21]. Noen internasjonale idrettsforbund ekskluderer utøvere med hematokrit eller hemoglobinnivåer over visse grenser fra deltakelse i konkurranser. Hovedmålet er å forhindre potensielle helseskader, men det er også ønskelig å forhindre misbruk av erythropoietin og analoger [53]. Faren er at dette fører til mer utbredt rhEPO-misbruk hvor utfordringen for utøveren blir

titrering av hemoglobin/hematokrit, for å oppnå, men ikke overstige, den bestemte terskelverdien. En annen metode som vil kunne hjelpe utøveren å holde seg under de gitte grensene er bruk av plasmaekspanderende midler. Ekskluderingsmetoden har dessuten fått kritikk fordi den vil kunne utelate utøvere med naturlig forhøyede hematokritverdier (opptil 5 %) [55].

Idrettsutøveres ulovlige bruk av rhEPO kan resultere i alvorlige helseeffekter. Et forhøyet nivå av røde blodceller fører til økt blodviskositet og en økt belastning på hjertet [11]. Risikoene er hjertestans eller -infarkt, slag og perifere trombedannelser [17]. Væsketapet ved fysisk aktivitet gir en ytterligere økt blodviskositet og gjør idrettsutøveren disponert for komplikasjonene som i verste fall kan føre til død [56].

NESP har vært et populært prestasjonsfremmende middel i idretten på grunn av større biologisk aktivitet og sjeldnere doseringsfrekvens enn rhEPO. I OL i Salt Lake City i 2002, kun kort tid etter at legemiddelet kom på markedet, ble langrennsløpere fra Russland og Spania avslørt for bruken av NESP [57]. For deteksjon av idrettsutøveres ulovlige bruk av rhEPO eller NESP analyseres urinprøver ved isoelektrisk fokusering i gel som beskrevet av Lasne *et al.* i 2001 [58].

Ved normale fysiologiske forhold tar modningen av erytroide celler 5-9 dager. Injeksjon av rhEPO fører derfor ikke til et akutt forhøyet erytrocytnivå [59]. For å oppnå maksimalt utbytte av rhEPO i idrettssammenheng må hormonet injiseres hver 2.-3. dag i en 3-4 ukers periode. Dette innebærer at misbruket må starte omtrent en måned før sesongstart eller konkurranse [55]. Ved seponering av rhEPO returnerer erytrocytnivået tilbake til normale verdier, men det kan ta uker før opprinnelig nivå nås [52]. Årsaken er at menneskekroppen ikke har aktive mekanismer for fjerning av erytrocytter [55]. Prestasjonsfordelene av rhEPO vedvarer dermed i opptil 3 uker etter seponering [53]. Da erytropoietinkonsentrasjonen i blod og urin er vist å returnere til normale verdier henholdsvis 7 og 4 dager etter siste administrasjon [59], vil det medføre at prestasjonsfordelene varer minst 2 uker lenger enn rhEPO kan detekteres. Tilfeldig testing av idrettsutøvere utenom konkurranser er derfor viktig for å avsløre ulovlig bruk av rhEPO i idretten.

2 Hensikt med oppgaven

For å øke mulighetene til å kunne detektere misbruk av erythropoietin hos idrettsutøvere, er det viktig å øke kunnskapen om ulikhetene mellom det endogene og rekombinante humane erythropoietin. rhEPO er godt karakterisert, men fullstendig strukturinformasjon om erythropoietin fra humant serum eller urin er ikke kjent. Metoden som i dag benyttes for avsløring av rhEPO-bruk [58] er tidkrevende og har høye deteksjonsgrenser. Dette medfører falske negative prøver, som igjen betyr at idrettsutøvere ikke blir avslørt ved bruk av rhEPO som et prestasjonsfremmende middel. Fullstendig karakterisering av endogent EPO vil avdekke strukturforskjeller i forhold til rhEPO som kan utnyttes i forbedring av metoden som benyttes i dag eller til å utarbeide en ny metode.

Rekombinant fremstilt erythropoietin er ett av de legemidlene som brukes mest i verden. For å forstå mekanismene bak legemiddelets fysiologiske effekter er det viktig med en fullstendig karakterisering av glykoproteinhormonet. Med kunnskap om hvilke strukturelle trekk som kreves for biologisk aktivitet vil erythropoietinanaloger med ønsket effekt kunne designes.

Hensikten med oppgaven var å utføre en videre karakterisering av erythropoietin fra human urin. Det ble fokusert på to hovedmål. Det første var å bestemme hvilke grupper som bidrar til de ekstra negative ladningene på uhEPO i forhold til det rekombinante hormonet. Da innledende forsøk tyder på at fosfatgrupper kan være involvert ble det forsøkt å påvise fosfatgrupper på uhEPO. Det andre målet var å bestemme lokaliseringen til de ekstra ladningene på glykoproteinet. Det ble først sett på om ladningene er lokalisert på proteinet eller sukkeret. Ved gradvis avspalting av monosakkaridene på sukkerstrukturene ble det så sett på hvilke monosakkarider som har og ikke har negativt ladde grupper knyttet til seg.

3 Materialer og metoder

3.1 OPPKONSENTRERING AV PROTEINER I URIN VED ULTRASENTRIFUGERING

3.1.1 Prinsipp

Ved å sentrifugere en urinprøve med proteiner gjennom et filter med en bestemt porestørrelse ("cut-off") vil molekyler med molekylstørrelse mindre enn porestørrelsen filtreres bort. En sitter igjen med en oppkonsentrert løsning av proteinene med molekylstørrelse større enn porestørrelsen. Desto høyere sentrifugehastighet og -tid, desto mer oppkonsentreres proteinene.

3.1.2 Prosedyre

20 ml urin overføres til 50 ml falconrør og tilsettes 400 µl complete protease inhibitor. Deretter tilsettes 2 ml 3,75 M Tris-HCl, pH 7,4, eller eventuelt litt mer enn dette for at pH skal bli over 7. Bunnfallet spinnes ned ved 3500 RPM (Heraeus Multifuge 3 S.R.) ved 20 °C i 10 minutter. Supernatanten filtreres gjennom 0,22 µm filtre ved vannsug (Steriflip, Millipore). Det benyttes Centricon plus 20 sentrifuge-enheter ("cut-off" 30 000 Da) fra Millipore til avsaltning og oppkonsentrering. Prøven appliseres i sentrifugeenheten og denne sentrifugeres ved 4000 RPM ved 20 °C i 20 minutter. Prøvebeholderen fylles opp med 20 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,4 og 400 µl complete protease inhibitor og det sentrifugeres på nytt. Konsentratet samles opp ved sentrifugering 2500 RPM 20 °C i 8 minutter.

Centricon YM-30 sentrifugeenheter ("cut-off" 30 000 Da) brukes til videre oppkonsentrering av små volum opptil 2 milliliter. Først fuktes membranen ved å spinne gjennom 500 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,4. Prøven sentrifugeres i Sorvall RC5B GSA rotor ved 6500 RPM i 90 minutter, før konsentratet samles opp ved sentrifugering (Sorvall RC 3C Plus) i 8 minutter ved 1900 RPM.

3.2 IMMUNOMAGNETISK EKSTRAKSJON

3.2.1 Prinsipp

Metoden er beskrevet av Skibeli *et al.*, 1998 [60]. Magnetiske kuler påkoblet anti-hEPO antistoff kan brukes til ekstraksjon av hEPO fra serum. Det brukes superparamagnetiske kuler som utøver magnetiske egenskaper i nærheten av et magnetisk felt, men ikke har noen magnetiske egenskaper når de fjernes fra det magnetiske feltet. shEPO bindes til antistoffet på kulene og det brukes en magnet for å skille kulene fra supernatanten. På denne måten kan shEPO isoleres fra de andre proteinene i serum. shEPO kan deretter elueres fra anti-hEPO og kulene.

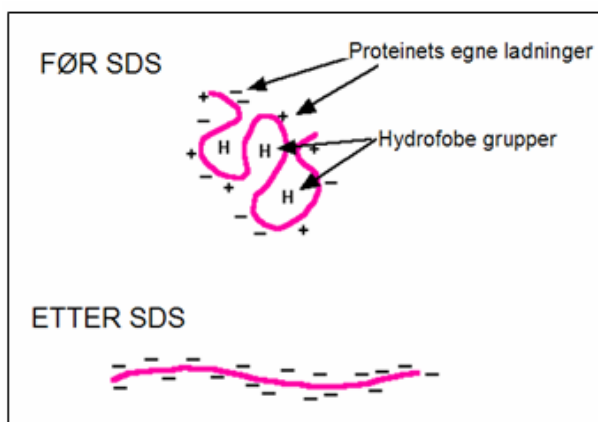
3.2.2 Prosedyre

Prosedyre og reagenser er beskrevet av Skibeli *et al.*, 1998 [60].

3.3 SDS-POLYAKRYLAMID GELELEKTROFORESE

3.3.1 Prinsipp

En vanlig metode for separering av proteiner etter størrelse er natrium dodecyl sulfat-polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) [61]. SDS er en anionisk detergent. Det bindes til hydrofobe deler av proteinet og denaturerer det. SDS maskerer proteinets egne ladninger og gir det en negativ ladning. På denne måten separeres proteiner kun på grunnlag av størrelsen. LDS er litiumsaltet av dodecyl sulfat og har samme effekt på proteinene som SDS. Dithiotreitol (DTT), en reduktant, bryter disulfidbroer i proteinet slik at proteinet lineariseres.

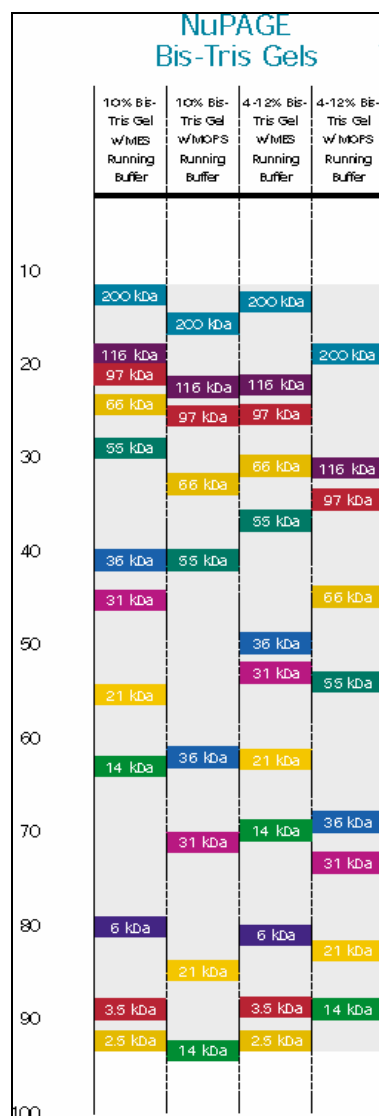


Figur 3.1: Proteinet før og etter behandling med SDS. SDS maskerer proteinets egne ladninger og gir det en negativ ladning [62].

Polyakrylamidgeler dannes ved polymerisering av en blanding av akrylamid og bis-akrylamid. Gelens porestørrelse bestemmes av konsentrasjonen av akrylamid og graden av kryssbinding. Polymerisering av akrylamidmonomerene initieres av ammoniumpersulfat (APS). Frie persulfatradikaler omdanner akrylamidmonomerer til frie radikaler som reagerer med uaktiverede monomerer og danner en polymerkjede. TEMED (tetramethylethyldiamin) tilsettes for å akselerere dannelsen av frie radikaler fra persulfat [63].

Ved diskontinuerlig gelelektroforese benyttes to ulike geler, en konsentrerende ("stacking") gel og en separerende. Bufferen inneholder "trailerioner" (f. eks. glycin eller tricin) og klorioner som vandrer med ulik hastighet i de ulike gelene. Den konsentrerende gelen har en lavere pH enn den separerende. Klorionene vil vandre raskt i front mens "trailerionene", på grunn av sin svake negative ladning, vil vandre sakte. Mellom klorionene og "trailerionene" dannes det et spenningsfelt hvor proteinene og markøren vandrer. Proteinene vil ikke kunne passere klorionene og det oppnås en oppkonsentrerende effekt når ionene når den separerende gelen og bremses opp. Den separerende gelen har høy kryssbindingsgrad og fører til at vandringshastigheten reduseres for proteinene. "Trailerionene" vil derimot vandre raskere fordi de har fått en sterkere negativ ladning [63]. Det vil ikke bli noen oppkonsentrerende effekt. Proteinenes vandringshastighet avhenger dermed av gelens porestørrelse og proteinenes størrelse. Jo mindre proteinene er, desto lenger vandrer de i gelen. Konsentrasjonen av akrylamid i gelen velges ut ifra størrelsen på proteinene som skal separeres. Høy konsentrasjon av polyakrylamid gir små porer, mens lav konsentrasjon gir store porer. Store proteiner separeres godt av geler med store porer og altså lave akrylamidkonsentrasjoner. For mindre proteiner oppnås best separasjon ved bruk av en gel med høy akrylamidkonsentrasjon [64].

Det benyttes to ulike elektroforesebuffer, MES og MOPS (Invitrogen). Bufferene gir ulikt migrasjonsmønster i den samme gelen (Figur 3.2). Det benyttes MES kjørebuffer for separasjon av små proteiner, for eksempel totalt deglykosylert erythropoietin. MOPS elektroforesebuffer benyttes for separasjon av proteinene med litt større størrelse, for eksempel intakt erythropoietin.



Figur 3.2: Oversikt over hvilken størrelse proteiner de ulike bufferene separerer best [65].

3.3.2 Prøveopparbeidelse

Prøvene tilsettes appliseringsbuffer (NuPAGE sample buffer) med 0,14 M Tris, 2 % LDS (litium dodecyl sulfat) og 10 % glyserol, tilsatt 500 mM DTT, og kokes i 3 minutter på vannbad før applisering på gelen.

3.3.3 Prosedyre

Det benyttes en vertikal elektroforeseenhet og ferdigstøpte, 1,0 mm tykke, diskontinuerlige geler (Invitrogen). Akrylamidkonsentrasjoner på enten 4-12 % eller 12 % i separerende gel benyttes, avhengig av størrelsen på proteinene som ønskes separert. Prøvene appliseres på toppen av gelen. Elektroforesen kjøres ved en konstant spenning på 200 V til fronten med

bromofenolblått har gått gjennom hele gelen. Den totale tiden på en elektroforese er 50-80 minutter, avhengig av bufferen som benyttes.

To ulike molekylvektstandarder fra BioRad benyttes;

For visualisering i gelen benyttes en standard som gir to ulike farger i gelen (Precision Plus Protein standard, dual color). Ved immunodeteksjon benyttes en biotinylert standard (Low range biotinylert SDS-PAGE standard) i 1:30-fortynning i 0,1 % BSA (bovint serumalbumin) i PBS (fosfatbufret saltvann).

Apparatur: XCell *SureLock*TM Mini-Cell (Invitrogen).

3.4 ISOELEKTRISK FOKUSERING (IEF)

3.4.1 Prinsipp

Isoelektrisk fokusering baserer seg på at ulike molekyler har ulike isoelektriske punkt. Proteiner er amfotære molekyler, som avhengig av pH har positiv eller negativ nettoladning, eller er nøytrale. Alle proteiner har nettoladning lik null ved en bestemt pH. Dette kalles proteinets isoelektriske punkt (pI). Ved denne pH-en vil ikke proteinet bevege seg i et elektrisk felt.

Ved bruk av amfolytter i en ureagel dannes en pH-gradient ved hjelp av et elektrisk felt. Det blir brukt amfolytter med et spekter av ulike isoelektriske punkter og under påvirkning av et elektrisk felt vil de samle seg i henhold til sin pI. Når en tilsetter et protein i dette systemet vil det få en ladning som avhenger av appliseringspunktets pH. Proteinets vil vandre mot elektroden motsatt av sin egen ladning. Migrasjonshastigheten vil synke ettersom proteinet blir mindre og mindre ladet, helt til proteinet stopper opp ved pH lik sin egen pI [63]. På denne måten kan proteiner med ulik pI separeres i gel.

3.4.2 Prøveopparbeidelse

Oppkonsentrerte prøver med EPO fra human urin fortynnes til 20 µl med 0,1 % BSA i PBS, tilsettes 4-10 mg urea og mikses godt. Rekombinante EPO-standarder varmes ved 80 °C i 3 minutter, avkjøles og tilsettes så Tween 80 til 1 %.

3.4.3 Prosedyre

Gelen plasseres på elektroforeseapparatet og prefokuseres ved 250 V, 28 mA, 24 W i 30 minutter for å danne en stabil pH-gradient. Etter denne forbehandlingen appliseres prøvene ved katoden. Proteinene separeres på en 24x11 cm og 1 mm tykk ureagel med pH-gradient 2-6. Metylrød brukes for å kontrollere vandringen under elektroforesen.

Elektroforesebetingelsene som brukes er 1 W per cm gel, V_{\max} 2000 V, 4000 Vh ved 8 °C.

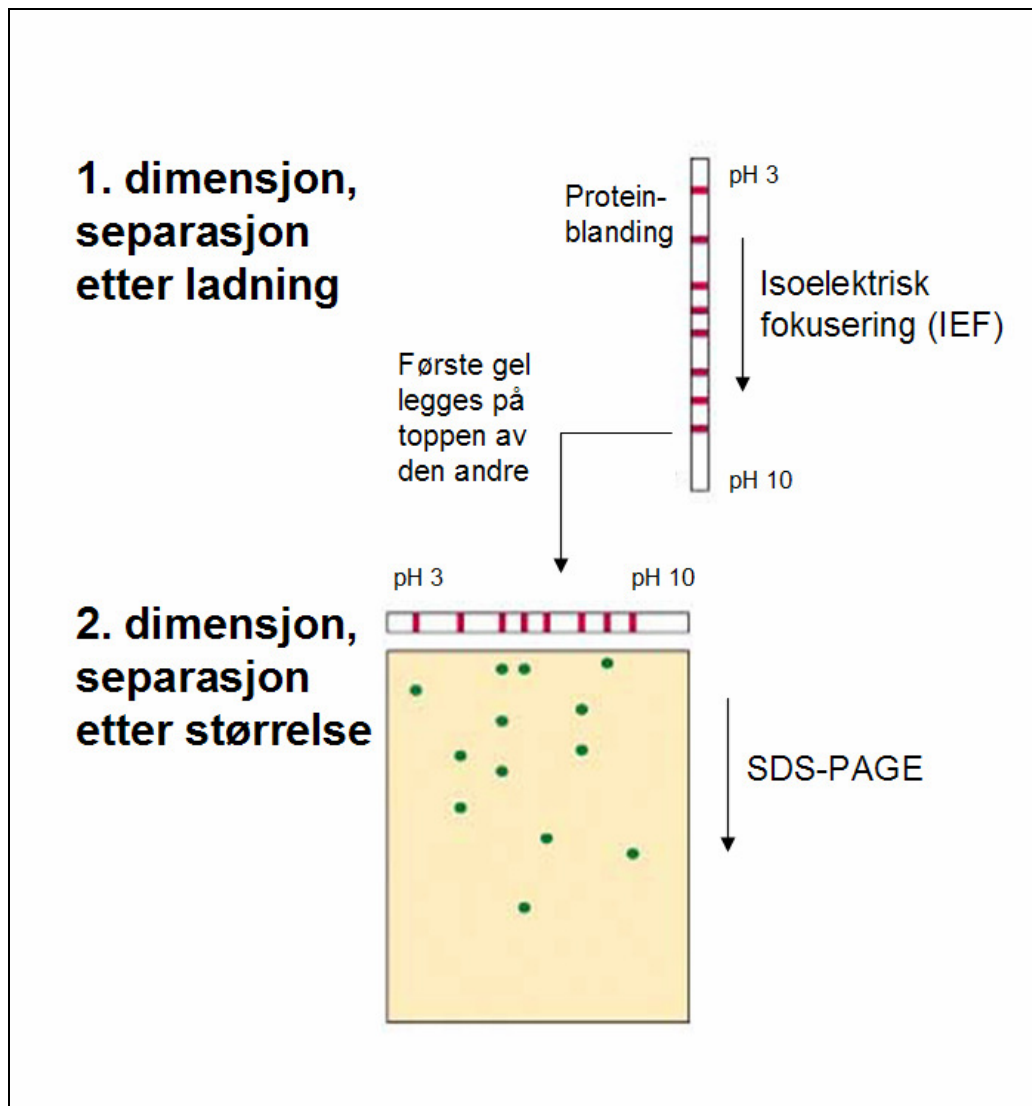
Den totale kjøretiden er mellom 3 og 4 timer.

Apparatur: Multiphor™ II og Multitemp™ III (Amersham Pharmacia Biotech).

3.5 TODIMENSJONAL (2D) ELEKTROFORESE

3.5.1 Prinsipp

Todimensjonal elektroforese er en kombinasjon av isoelektrisk fokusering og SDS-PAGE. Proteinene separeres både med hensyn på ladning og størrelse. 1 dimensjon er en isoelektrisk fokusering. Det benyttes tynne strips med immobiliserte pH-gradienter (IPG-strips) til å separere proteinene etter ladning. Stripsene består av en polyakrylamidgel støpt på en plastfilm, med IPG-monomere (akrylamidderivater med ulik pH) kovalent bundet til seg. For å forbedre proteinvandringen fra IPG-stripsen over i polyakrylamidgelen må proteinene denatureres ytterligere mellom 1. og 2. dimensjon i en equilibreringsbuffer inneholdende DTT [66]. Deretter legges stripsen på toppen av en vertikal polyakrylamidgel og dekkes med 0,5 % agaroseløsning. Under 2. dimensjon separeres proteinene etter ladning som ved en vanlig SDS-PAGE. 2D elektroforese kan dermed separere proteiner med lik størrelse og ulik ladning. Metoden gir et mer fullstendig bilde av proteinene som separeres sammenliknet med IEF eller SDS-PAGE.



Figur 3.3: Todimensjonal gelelektroforese. 1. dimensjon er en isoelektrisk fokusering som separerer proteinene etter ladning på tynne IPG (immobilisert pH-gradient)-strips. 2. dimensjon er en SDS-PAGE (polyakrylamid gelelektroforese) som separerer proteinene på bakgrunn av størrelse.

Det ble under forsøkene observert en kontrollert vandring av fronten gjennom hele polyakrylamidgelen.

3.5.2 Prosedyre

1. DIMENSJON

7 cm lange IPG-strips fra GE Healthcare med totalt prøvevolum 125 μ l og 11 cm lange IPG-strips fra BioRad med totalt prøvevolum 200 μ l benyttes. Prøver med ca 1 ng EPO blandes med rehydreringsbufferen (RH-buffer, oppskrift; vedlegg 2) og legges i svellekar. IPG-stripsen legges med gelen ned mot prøven og det legges coverfluid på toppen slik at systemet er helt tett for luft. Stripsen svelles over natt beskyttet mot lys.

Neste dag fuktes små elektrodepapirbiter med 10 µl vann og legges på elektrodene i 1. dimensjonskaret. Stripsen legges med gelen ned slik at gelen ligger over elektrodene på begge sidene. Coverfluid tilsettes så denne dekker stripsene. Lokket settes på, spenningen settes på og fokuseringen starter.

Tabell 3.1: Betingelser for isoelektrisk fokusering på IPG (immobilisert pH-gradient)-strips etter anbefalinger fra BioRad og GE Healthcare.

IPG strips	Type spenning	Spenning (V)	Tid (t:min)	kVh
7 cm pH 3-10 NL	1 Stigning og konstant	300	0:30	0,2
7 cm pH 3-5,6 NL	2 Gradient	1000	0:30	0,3
	3 Gradient	5000	1:30	4,5
	4 Stigning og konstant	5000	0:12-0:36	1,0-3,0
			2:42-3:06	6,0-8,0
11 cm pH 3-6	1 Stigning og konstant	300	0:30	0,2
	2 Stigning og konstant	8000	ca 4:00	20,0

Apparatur: BioRad Protean IEF Cell (BioRad).

2. DIMENSJON

Etter 1. dimensjon equilibreres IPG-stripsene i 2 x 15 minutter. Første equilibrering utføres i 2,5 ml equilibreringsbuffer (EQ-buffer, oppskrift; vedlegg 2) tilsatt 25 mg DTT. Andre equilibrering utføres i 2,5 ml equilibreringsbuffer tilsatt 56 mg iodoacetamid for å fjerne DTT i overskudd [67]. Det benyttes 4-12 % IPG-geler fra Invitrogen. Stripsen plasseres i brønningen og det fylles på med 0,5 % agaroseløsning med bromofenolblå på toppen slik at stripsen blir liggende i samme posisjon under hele gelelektroforesen. Bufferen som brukes varierer i forhold til størrelsen på proteinene som skal separeres (Figur 3.2). NuPAGE antioksidant tilsettes bufferen i det øvre buffer-kammeret. Elektroforesen kjøres ved 100 V i 20 minutter for å gi proteinene en forsiktig overgang fra IPG-stripsen til akrylamidgelen. Deretter økes spenningen til 200 V og holdes der til fronten med bromofenolblå har migrert gjennom hele gelen. Total kjøretid er 70-90 minutter.

Det benyttes de samme molekyelvektstandardene som ved SDS-PAGE, se punkt 3.3.3.

Apparatur: XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen).

3.6 ELEKTROBLOTTING

3.6.1 Prinsipp

Ved elektroblotting overføres proteiner fra en gel til en membran ved hjelp av elektrisitet. Det benyttes en PVDF (polyvinyl difluorid)- membran som binder hydrofobe deler av proteinet ved hydrofobe interaksjoner. Proteinene på membranen kan deretter detekteres ved immunodeteksjonsmetoder.

3.6.2 Prosedyre

Elektroblotting av SDS-PAGE-geler

Membraner og filterpapir kuttet i samme størrelse som gelen. PVDF-membranen er hydrofob og aktiveres først ved å inkuberes 15 sekunder i metanol etterfulgt av 2 minutter i vann og deretter minst 10 minutter i blottebuffer 1 (oppskrift; vedlegg 2) tilsatt antioksidant.

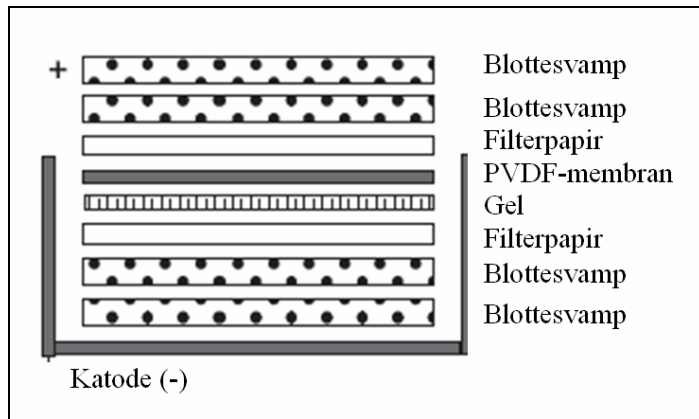
Filterpapirbunker på 9, samt svamper fuktes i blottebufferen før blottingen. Svamper, filterpapirbunker, gel og membran legges i bunker som vist i Figur 3.4. For å fjerne eventuelle luftbobler brukes en rulle forsiktig oppå filterpapirbunkene. Bunken legges i blotteenheten med gelen nærmest katoden (-). Proteinene, som nå er negativt ladet, vil vandre fra katoden mot anoden når strømmen settes på og vil derfor bli bundet til membranen. Det benyttes blottebuffer inne i blotteenheten og vann på utsiden for å avkjøle systemet. Betingelsene for elektroblottingen er 30 V konstant i 1 time.

Apparatur: XCell II™ Blot Module i XCell *SureLock*™ (Invitrogen).

Elektroblotting av IEF-geler

Ved elektroblotting etter IEF brukes blottebuffer 2 (oppskrift; vedlegg 2). Her benyttes ikke svamper som for våtblottingen, men ellers er sammensetningen av filterpapir og membraner den samme. Gelen blottes ved $0,8 \text{ mA/cm}^2$ i 30 minutter.

Apparatur: Semi Dry Multi Gel Electroblotter, modell B (Ancos).



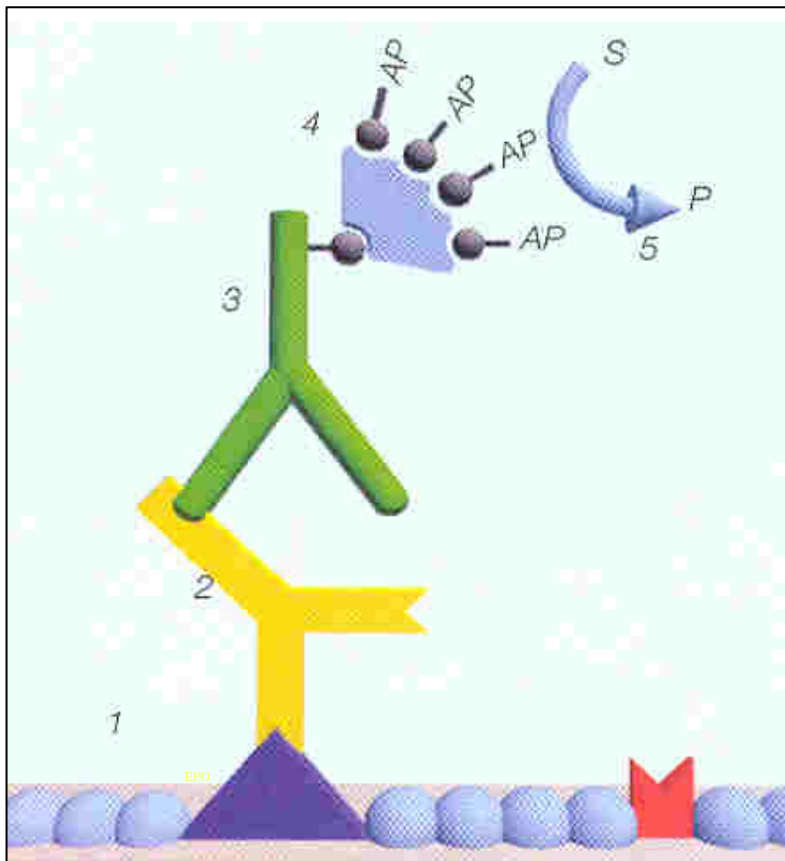
Figur 3.4: Sammensetning av membraner og filtre ved elektroblottingen [68].

3.7 IMMUNODETEKSJON

3.7.1 Prinsipp

Etter elektroblottingen blokkeres ledige bindingssteder på membranen med andre proteiner i overskudd. Det benyttes 5 % tørrmelk eller 3 % BSA. På denne måten forhindres uspesifikk binding av primært antistoff. Membranen inkuberes så med et primært antistoff rettet mot proteinene av interesse. Etter vasking for å fjerne primært antistoff i overskudd, inkuberes membranen med et sekundært antistoff. Dette er rettet mot immunoglobuliner fra den dyrearten det primære antistoffet er produsert i. Det sekundære antistoffet har biotin bundet til seg.

Streptavidin er et tetramert protein som bindes svært spesifikt til biotin. Ved inkubering med streptavidin-HRP (pepperrot peroksidase) vil streptavidin sørge for spesifikk binding til biotin konjugert til det sekundære antistoffet.



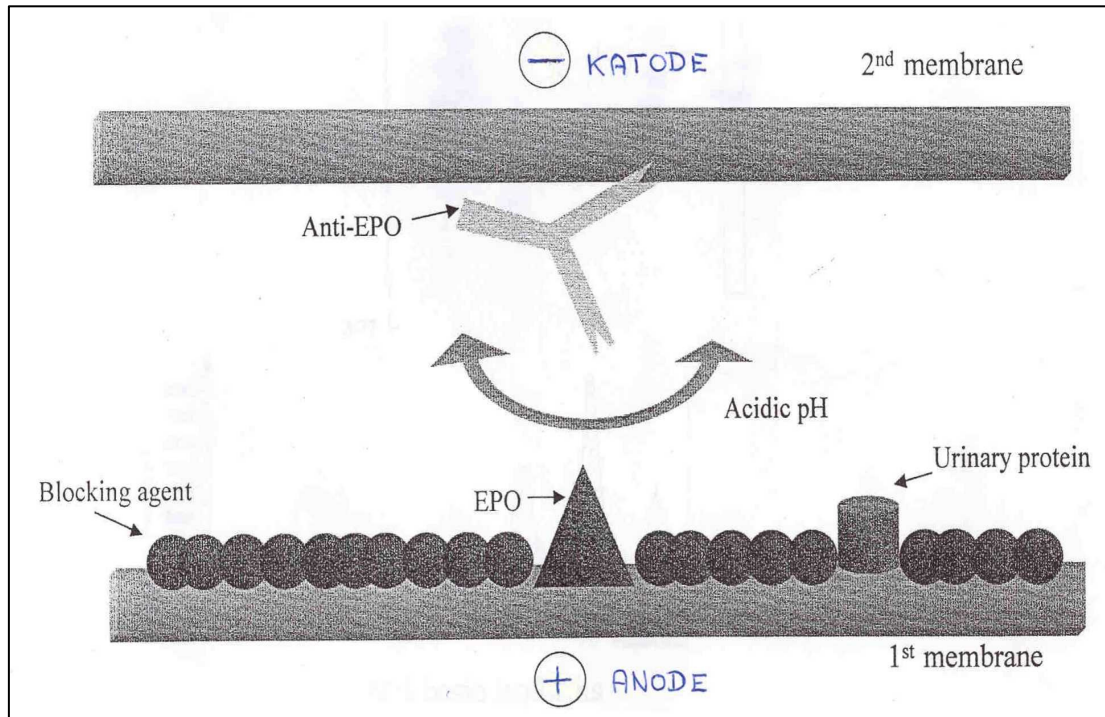
Figur 3.5: Immunodeteksjon av et protein på en PVDF-membran etter gelelektroforese og elektroblotting. 1: Antigen. 2: Primært antistoff. 3: Sekundært antistoff. 4: Streptavidin-HRP (pepperrot peroksidase). 5: Substratreaksjon: Luminol oksideres og avgir lys.

Når energi i form av lys frigjøres ved en kjemisk prosess kalles det kjemiluminescense. Dette er en metode som brukes mye for visualisering av proteiner etter gelelektroforese og elektroblotting. Luminol er et av de mest brukte kjemiluminescense-substratene. HRP vil med hydrogenperoksid tilstede oksidere luminol til 3-aminofthalat, som frigjør lys ved 425 nm [69]. Ved bruk av et CCD (charge coupled devise)-kamera som omdanner lys til elektriske signaler fås et digitalt bilde. Intensiteten til bildet fra CCD-kameraet er direkte proporsjonal med lysintensiteten, noe som muliggjør kvantifisering av proteinet [70].

DOBBELTBLOTTING

Ved immunodeteksjon er det alltid en fare for uspesifikk binding av sekundært antistoff til proteiner bundet på membranen. Dette vil gi falske signaler. For å unngå dette har en teknikk kalt "dobbeltblotting" blitt utviklet. Dette er en metode hvor det primære antistoffet på den første PVDF-membranen overføres til en ny membran ved hjelp av strøm, før inkubering med sekundært antistoff [58]. Metoden har blitt utviklet for bruk i rutineanalyse av rhEPO i urin

med hovedmål å redusere falske positive prøver. Ved å inkludere dobbeltblottingen ved immunodeteksjonen oppnås spotter som med mye større sikkerhet kan identifiseres som hEPO.



Figur 3.6: Dobbeltblotting. Sur pH gjør at det primære antistoffet (anti-hEPO IgG) spaltes fra antigenet (hEPO) og ved hjelp av et elektrisk felt overføres det til en ny PVDF-membran [58].

Sur pH gir det primære antistoffet en positiv ladning og ved tilførsel av et elektrisk felt vil det migrere mot katoden og dermed dissosiere fra antigenet. Siden surheten ikke har innvirkning på hydrofobe interaksjoner, forblir antigenet og interfererende proteiner på den første membranen. Dette gjør at den første membranen igjen kan inkuberes med primært antistoff og detekteres ved tradisjonell immunodeteksjon eller dobbeltblottes på nytt [58].

Etter dobbeltblottingen blokkeres den andre PVDF-membranen før den inkuberes med sekundært antistoff uten risiko for uspesifikk binding til uønskede proteiner.

3.7.2 Prosedyre

Etter overføring av proteinene til en PVDF-membran ved elektroblotting, behandles membranen på følgende måte:

1. Blokkering i 5 % tørrmelk eller 3 % BSA i PBS 1 time ved romtemperatur eller over natt ved 4 °C.
2. Inkubering med primært antistoff 1 time ved romtemperatur.
3. Seks ganger vask med vaskevann.
4. Inkubering med sekundært antistoff 1 time ved romtemperatur eller over natt ved 4 °C.
5. Seks ganger vask med vaskevann.
6. Inkubering med streptavidin-HRP fortynnet 1:2000 i 1 % tørrmelk i PBS eller 1 % BSA i PBS, 1 time ved romtemperatur.
7. Seks ganger vask med PBS.
8. Inkubering 5 minutter med kjemiluminescenssubstrat.
9. Deteksjon av signalene i CCD-kamera ved kjemiluminescense.

Tabell 3.2: Oversikt over reagenser og fortynninger brukt ved ulike immunodeteksjoner.

	Deteksjon av hEPO	Deteksjon av fosfatgrupper tilknyttet aminosyren serin
Blokkering	5 % tørrmelk i PBS	3 % BSA i PBS
Primært antistoff	Monoklonalt mus anti-hEPO, klon AE7A5, fortynnet 1:1000 i 1 % tørrmelk i PBS	Polyklonalt kanin anti-fosfoserin, klon Z-PS1, fortynnet 1:160 i 0,1 % BSA i PBS
Vaskevann	0,5 % tørrmelk i PBS	0,1 % Tween 20 i PBS
Sekundært antistoff	Biotinylert anti-mus immunoglobulin, fortynnet 1:4000 i 1 % tørrmelk i PBS	Biotinylert anti-kanin immunoglobulin, fortynnet 1:50 000 i 1 % BSA i PBS

DOBBELTBLOTTING

Etter at den første PVDF-membranen er blokkert og inkubert med primært antistoff overføres det primære antistoffet til en ny PVDF-membran ved elektroblotting. Det kuttes membraner og filterpapir i samme størrelse som den første membranen. Den nye PVDF-membranen klargjøres som ved første blotting med 0,7 % eddiksyre som blottebuffer. En Duraporemembran og filterpapirbunker fuktes i blottebufferen. Mot anoden legges ni filterpapir, deretter den første PVDF-membranen med proteinene vendt mot katoden, deretter en Duraporemembran før den nye PVDF-membranen og en ny bunke med ni filterpapir. For å fjerne eventuelle luftbobler brukes en rulle forsiktig oppå filterpapirbunkene. Betingelser for dobbeltblottingen er $0,8 \text{ mA/cm}^2$ i 10 minutter [58].

Apparatur:

Nova Blot elektroblotter (Amersham Pharmacia Biotech),

Fuji LAS1000 CCD-kamera (charge coupled devise)

Programvare: LAS1000Lite (styrer kameraet), Aida Version 2.43 (kvantifiseringsverktøy).

3.8 FARGING AV FOSFATGRUPPER I GEL

3.8.1 Prinsipp

Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain er en farge som selektivt farger fosfoproteiner i polyakrylamidgeler. Fargen kan brukes både på SDS-polyakrylamidgeler og på 2D-geler. Gelfargen inneholder et fluorescerende stoff som gjenkjenner fosfatgrupper på proteiner og peptider direkte i gelen. Visualisering gjøres ved å måle fluorescens, og styrken på signalet korrelerer med antall fosfatgrupper på proteinet.

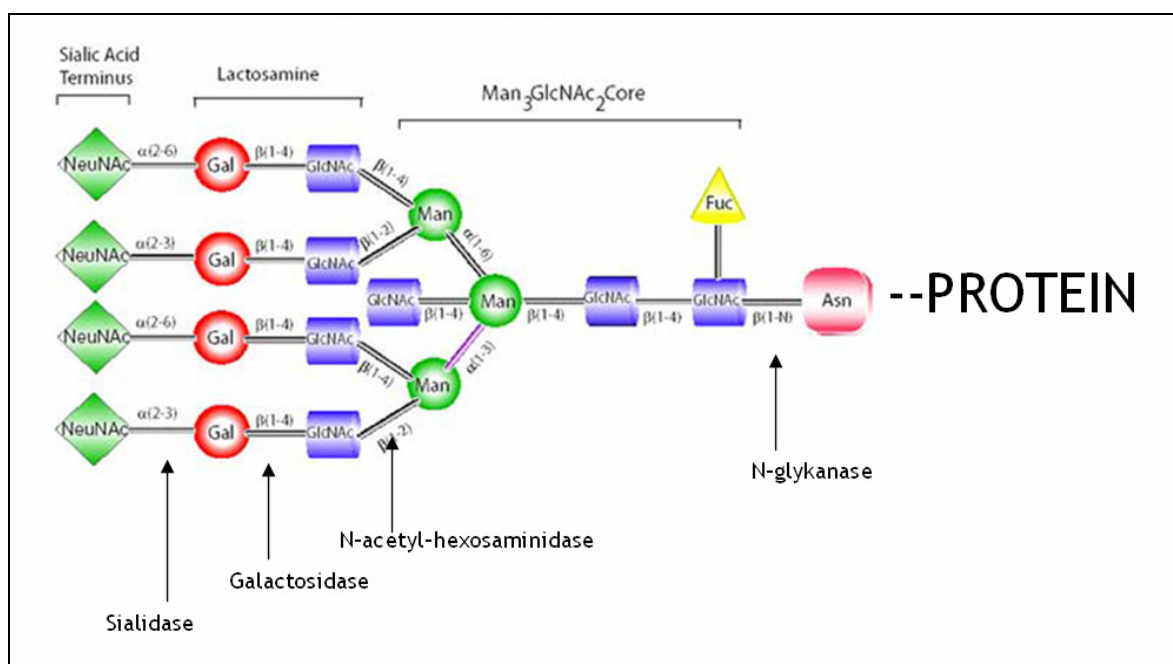
3.8.2 Prosedyre

Etter gelelektroforese behandles gelen på følgende måte:

1. Gelen fikseres i 100 ml fikseringsløsning som består av 50 % metanol og 10 % eddiksyre, 30 minutter ved romtemperatur.
Dette gjentas en gang, og kan da stå over natt (romtemperatur).
2. Vask med vann 3 ganger, 10 minutter hver gang.
3. Farging med 50 ml Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain i 70 minutter ved romtemperatur.

4. Avfarging med 80-100 ml Destain Solution i 30 minutter ved romtemperatur. Dette gjentas 2 ganger. Dette er viktig for å redusere gelens bakgrunnssignal og signalet fra uspesifikk binding.
5. Vask med vann 2 ganger, 5 minutter hver gang.
6. Deteksjon av signalene i CCD kamera ved fluorescens.

3.9 DEGLYKOSYLERING AV HUMANT ERYTROPOIETIN



Figur 3.7: Oversikt over N-sukkerenes oppbygning og hvor de ulike enzymene virker [32]. NeuNAc: α -N-acetylneuraminsyre (sialinsyre). Gal: β -D-galaktose. GlcNAc: β -D-N-acetylglucosamin. Man: β -D-mannose. Fuc: α -L-fucose. Asn: Asparagin.

3.9.1 Enzymatisk spalting av N-bundet sukker

Prinsipp

Erythropoietin har karbohydratkjeder bundet til aminosyren asparagin (N-glykosylering) tre steder på proteinet. Enzymet N-glykanase (PNGase) spalter bindingen mellom asparagin på proteinet og GlcNAc på sukkerdelen, og kan dermed brukes til å fjerne alle N-sukkerene på erythropoietin.

Prosedyre

0,01 U/ μ l N-glykanase inkuberes med erythropoietin i 50 mM natriumfosfatbuffer pH 7,5 med 10 mM EDTA og 0,02 % NaN₃. Prøven settes i en hybridiseringsovn ved 37 °C over natt. Reaksjonen stoppes ved nedfrysing ved -20 °C.

3.9.2 Enzymatisk spalting av sialinsyrer fra N- og O-bundet sukker

Prinsipp

N- og O-glykaners struktur har ofte sialinsyrer terminalt bundet. Disse er negativt ladet. Erytropoietin som har tre N-bundne og ett O-bundet sukker, kan ha maksimalt 14 sialinsyrer. CHO (chinese hamster ovary) -celler mangler aktivt enzym av sialyl- α -(2-6)-transferase. Rekombinant erytropoietin produsert i CHO-celler inneholder derfor kun α -(2-3) bindinger til sialinsyrene. Humant erytropoietin derimot har både α -(2-3) og α -(2-6)-bindinger mellom oligosakkaridstrukturene og sialinsyrene. Sialidaser er enzymer som spalter sialinsyrene fra resten av oligosakkaridstrukturen. Det ble brukt sialidaser som spalter både α -(2-3) og α -(2-6)-bindinger.

Prosedyre

0,1-0,2 mU/ μ l Glyko Sialidase V inkuberes med erytropoietin i 50 mM natriumacetat, 4 mM kalsiumklorid og 100 μ g/ml BSA (pH 5,5) i en hybridiseringsovn ved 37 °C i 24 timer. Reaksjonen stoppes ved nedfrysing ved -20 °C.

3.9.3 Enzymatisk spalting av O-bundet sukker

Prinsipp

Erytropoietin har en karbohydratkjede bundet til aminosyren serin-126 med en O-glykosidbinding. Enzymet Endo- α -N-acetylgalactosaminidase (O-glycosidase) spalter av sukkerkjeder som er bundet til serin og treonin. For at enzymet skal kunne virke må sialinsyrene på sukkerkjedene allerede være spaltet av.

Prosedyre

Sialinsyrene spaltes av ved inkubering med 0,1-0,2 mU/ μ l sialidase i en hybridiseringsovn ved 37 °C over natt. Se prosedyren under 3.9.2. Deretter tilsettes prøven 0,1 mU/ μ l O-glycosidase og inkuberes igjen i 50 mM natriumfosfatbuffer pH 7,5 med 10 mM EDTA og 0,02 % NaN₃ i hybridiseringsovnen ved 37 °C over natt. Reaksjonen stoppes ved nedfrysning ved -20 °C.

3.9.4 Enzymatisk spalting av β -D-galaktose (Gal)

Prinsipp

Det første sukkermolekylet innenfor sialinsyrene er galaktose (Figur 3.7). Galaktose er bundet med en β -(1-4)-binding til det neste sukkermolekylet, β -D-N-acetylglukosamin (GlcNAc).

Enzymet β -galactosidase spalter β -(1-4)-bindingene mellom galaktose og β -D-N-acetylglukosamin.

Prosedyre

0,05 mU/ μ l β -galactosidase inkuberes med erythropoietin behandlet med sialidase i 50 mM kaliumfosfatbuffer pH 7,8 med 1 mM MgCl_2 og 0,1 M 2-merkaptoetanol i en hybridiseringsovn ved 37 °C i 3 timer. Reaksjonen stoppes ved nedfrysning ved -20 °C.

3.9.5 Enzymatisk spalting av β -D-N-acetylglukosamin (GlcNAc)

Prinsipp

Innenfor galaktosemolekylene er β -D-N-acetylglukosamin bundet til β -D-mannose med β -(1-2) og (1-4)-bindinger. Enzymet β -N-acetyl-hexosaminidase katalyserer hydrolysen av terminale galaktosamin- og glukosamin-enheter fra oligosakkarider.

Prosedyre

Erythropoietin behandlet med sialidase og β -galactosidase inkuberes med 5-10 mU/ μ g β -N-acetyl-hexosaminidase i 50 mM natriumcitratbuffer pH 4,5 i en hybridiseringsovn ved 37 °C over natt. Reaksjonen stoppes ved nedfrysning ved -20 °C.

3.9.6 Enzymatisk spalting av fosfatgrupper

Prinsipp

Enzymet Lambda Protein Fosfatase (λ -PPase) er en MnCl_2 -avhengig protein fosfatase som spalter av fosfatgrupper koblet til aminosyrene serin, treonin og tyrosin.

Prosedyre

Erythropoietin inkuberes med 2 U/ μ l λ -PPase i en λ -PPase-reaksjonsbuffer med 2 mM MnCl_2 i en varmeblokk ved 30 °C i 6 timer. Reaksjonen stoppes ved nedfrysning til -20 °C.

3.9.7 Kjemisk spalting av O-bundet sukker

Prinsipp

Milde alkaliske betingelser fremmer hydrolyse av O-glykosid-bindinger fra proteinkjeden (β -eliminasjon) [71].

Prosedyre

1 μ l 0,1 M NaOH per μ g glykoprotein inkuberes ved romtemperatur under rotasjon. Det tas ut prøver ved tiden 0 minutter, 1 time, 2 timer, 6 timer og over natt. Reaksjonen stoppes ved tilsetning av 2 M eddiksyre og prøvene oppbevares ved -20 °C.

4 Resultater

Det ble benyttet human urin EPO fra tre ulike kilder. En frysetørret standard, som er EPO rensset fra en blanding av mange forskjellige uriner fra friske personer, samt prøver fra to anemipasienter med erytropoietinproduksjonen på høygir. Standarden blir heretter omtalt uhEPO og prøvene fra anemipasient A og B henholdsvis uhEPO-A og uhEPO-B. Omtrentlige konsentrasjoner på uhEPO er 3000 IE/L og 300 IE/L for henholdsvis anemipasient A og B. 16 ml urin oppkonsentreres om gangen til et volum på ca 50 µl. Fra anemipasient B er også serumprøver tilgjengelig (shEPO-B), med en EPO-konsentrasjon på ca 25 000 IE/L. 14 ng endogent EPO tilsvarer 1 IE. Denne sammenhengen er brukt for beregning av påsatt mengde i de ulike forsøkene.

Det ble i oppgaven foretrukket å bruke uhEPO fra anemipasienter fremfor standarden som er arbeidet med og frysetørret. Påvisning av fosfatgrupper på uhEPO ble prioritert, og fordi mengden urin fra anemipasienter var begrenset, ble denne i hovedsak brukt i disse forsøkene.

4.1 METODEUTVIKLING AV 2D ELEKTROFORESE FOR ERYTROPOIETIN

Ved å benytte todimensjonal gelelektroforese til separasjon av erytropoietins ulike glykoformer separeres de på bakgrunn av ladning og størrelse i samme system, som beskrevet i kapittel 3.5.1. Ved bruk av systemene BioRad Protean IEF Cell og XCell SureLock™ var målet en helhetlig karakterisering av humant erytropoietin.

Ved dopinglaboratoriene blir rhEPO i urin analysert ved hjelp av isoelektrisk fokusering og immunodeteksjon med dobbeltblotting som beskrevet av Lasne *et al.* i 2001 [58]. IEF egner seg ikke til videre karakterisering av humant EPO fordi metoden kun gir informasjon om pI i et lite pH-intervall (2-6). Det var derfor nødvendig å optimalisere 2D elektroforese for erytropoietin for å kunne arbeide med en videre karakterisering av hormonet.

2D elektroforese er en relativt tidkrevende metode som består av mange steg. Dette fører til at feil eller ulikheter kan utføres mange steder i metoden. Utføres ikke en metode rutinemessig kan det være vanskelig å være klar over de kritiske stegene, samt å utføre disse på lik måte

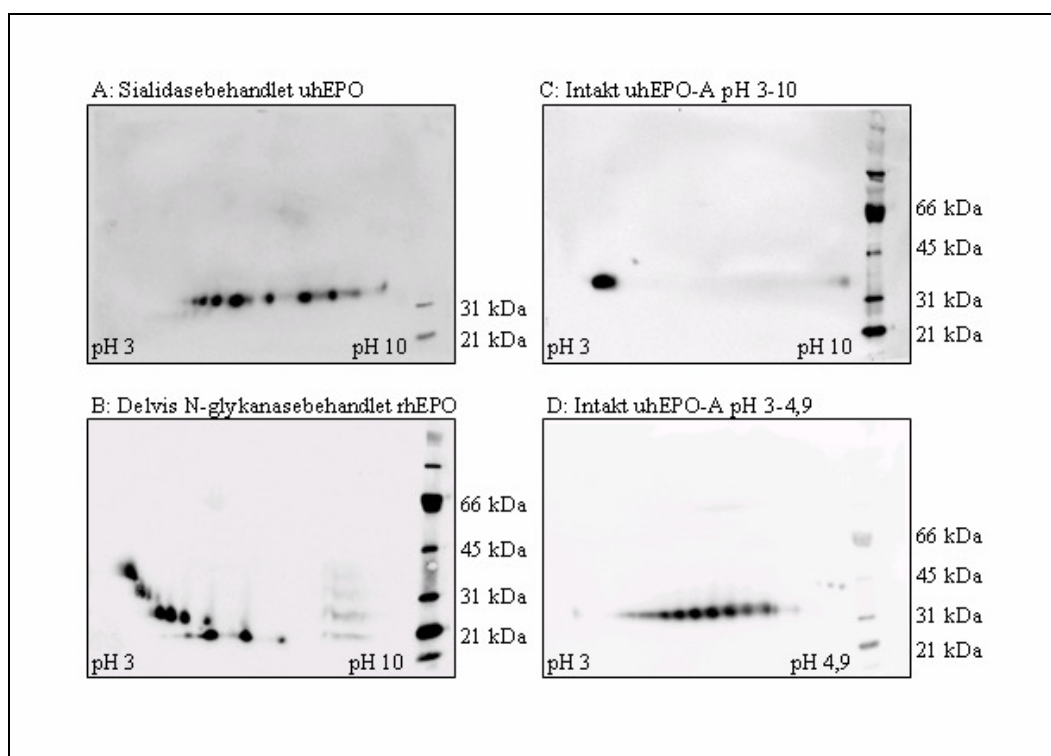
hver gang. For at ulike operatører skal kunne utføre metoden likest mulig ble det laget et detaljert krysseskjema.

4.1.1 Optimalisering av systemet

Uttesting av ulike pH-gradienter

IPG-strips finnes i et bredt utvalg lengder og pH-gradienter. Det ble i oppgaven benyttet både 7 cm og 11 cm lange strips. Type IPG-strips ble valgt ut i fra pI'en til EPO-formene som var ønskelig å separere. Det ble benyttet 7 cm strips med ikke-lineære pH-gradienter på 3-10 og 3-5,6. Stripsene på 11 cm som ble benyttet hadde en lineær pH-gradient på 3-6.

Ved bruk av strips med brede pH-gradienter oppnås maksimal separasjon av proteinblandinger bestående av proteiner/glykoformer med stor spredning i pI. Eksempler er når humant erythropoietin spaltes med sialidase (Figur 4.1 A) eller spaltes ufullstendig med N-glykanase (Figur 4.1 B). Strips med smalere pH-gradienter og altså flere cm gel per pH-enhet gir bedre separasjon av proteiner/glykoformer med liten spredning i pI (Figur 4.1 C og D). Intakt hEPO sees som en spott ved bruk av en bred pH-gradient, mens en strips med smalere pH-gradient gir et bedre bilde av hEPOs glykoformer.



Figur 4.1: 2D elektroforese av hEPO på 7 cm lange IPG-strips, pH 3-10, etterfulgt av immunoblotting. Molekylvektstandarden vises til høyre i hvert bilde. Unntak: Figur D: 11 cm IPG-strips pH 3-6 er brukt og klippet til 7 cm før 2. dimensjon fordi samme størrelse akrylamidgel alltid ble brukt. Dette gir en pH-gradient på 3-4,9 på den 7 cm lange stripsen som legges i IPG-brønneren til akrylamidgelen.

- Desialisert uhEPO (0,56 ng). Desialisert uhEPO består av en rekke glykoformer med stor spredning i pI og separeres derfor godt på en IPG-strips med bred pH-gradient.
- rhEPO behandlet med N-glykanase i 20 minutter (1 ng) og intakt rhEPO (0,25 ng). rhEPO inkubert med N-glykanase (PNGase) i 20 minutter gir et fint bilde av de ulike glykoformene ved bruk av en IPG-strips med bred pH-gradient.
- Intakt uhEPO-A (1,3 ng). Intakt uhEPO har liten spredning i pI hos sine glykoformer. 2D elektroforese på IPG-strips pH 3-10 gir liten separasjon med hensyn på ladning.
- Intakt uhEPO-A (6,7 ng). Intakt uhEPO med pI på omtrent 3,5-4 separeres godt på strips med smale pH-gradienter i dette området. Intakt uhEPO består også av glykoformer med spredning i pI selv om dette er vanskelig å se ved bruk av strips med brede pH-gradienter (figur 4.1.C).

Behandlingen av IPG-stripsene

Den todimensjonale gelelektroforesen er såpass tidkrevende at det er hensiktsmessig å vite noe om hvor og hvordan det er mulig å avbryte prosedyren for senere å fortsette arbeidet. Det er kjent at IPG-stripsene kan fryses mellom 1. og 2. dimensjon. Det ble forsøkt å fryse IPG-strips etter svelling og før 1. dimensjon. Forsøket gav like gode resultater som uten frysing og viste at dette er en mulighet for å effektivisere prosedyren.

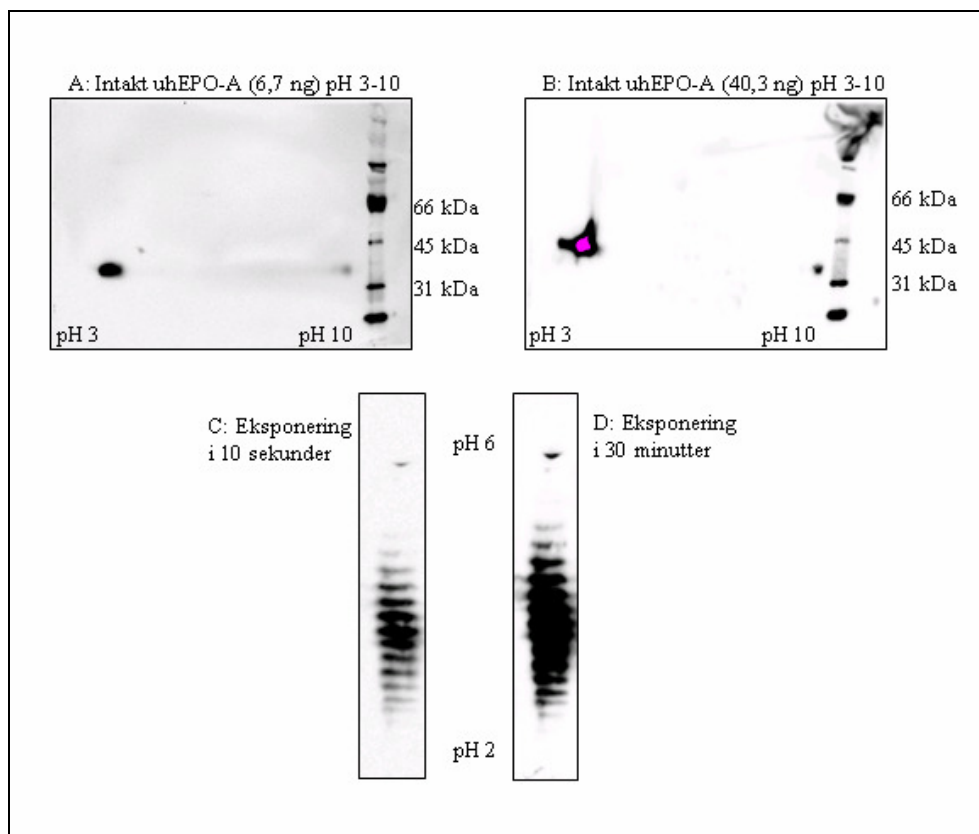
I XCell *SureLock*TM Mini-Cell (Invitrogen) kjøres to geler parallelt. To strips equilibreres fortløpende; 15 minutter i EQ-buffer tilsatt DTT, 15 minutter i EQ-buffer tilsatt iodoacetamid (IAA) (3.5.2), for deretter å legges i IPG-brønnene. For å utnytte reagensene best mulig ble det forsøkt å bruke den samme EQ-bufferen med IAA for begge stripsene. Resultatet var like bra for begge strips. Dette ble derfor utført i de senere forsøk. Det var ønskelig å utføre de to equilibreringsstegene rett etter hverandre for å unngå inntørking av stripsen. For å få til dette ved kjøring av begge dimensjonene samme dag, samt å bruke samme EQ-buffer med IAA til begge strips, ble den ene stripsen forsøkt latt liggende i 1. dimensjonskaret i 15 minutter (mens den andre stripsen ble equilibrert i EQ-buffer med DTT) før den ble lagt i EQ-bufferen med DTT. Gode resultater gjorde at det ble utført slik i senere forsøk.

Stripsene som var 11 cm lange ble klippet til 7 cm før 2. dimensjon for å passe i IPG-brønnen i akrylamidgelen, fordi det alltid ble brukt geler av samme størrelse. Proteinene av interesse er negativt ladet og samler seg derfor ved anoden (+). Det ble derfor klippet av en del av stripsen på katodesiden (-) før 2. dimensjon.

Påsatt mengde erythropoietin

Sammenliknet med SDS-PAGE har todimensjonal gelelektroforese en noe høyere deteksjonsgrense grunnet flere steg samt at prøven fordeler seg i flere spotter. Det er likevel viktig å ikke sette på for mye prøve da bildet vil kunne bli overeksponert og en kvantitativ beregning ikke vil være mulig. Ulike mengder erythropoietin applisert ble testet for å finne den optimale intensiteten på kjemiluminescense-signalene for videre kvantitativ beregning.

Forsøkene viste at 1 ng rhEPO og 0,56 ng uhEPO egnet seg godt. Dette er dobbel mengde av det som gir gode signaler på en SDS-PAGE. For uhEPO fra anemipasienter må en noe større mengde påsettes. Intensiteten på signalene kan til en viss grad styres av eksponeringstid (Figur 4.2 C og D). Egnet eksponeringstid kan være ulik for ulike forsøk og er avhengig av påsatt mengde protein. Det er likevel viktig å ikke sette på for mye prøve, da dette vil kunne gi for sterke signaler til at kvantitativ beregning er mulig, selv ved kort eksponeringstid (Figur 4.2 A og B).

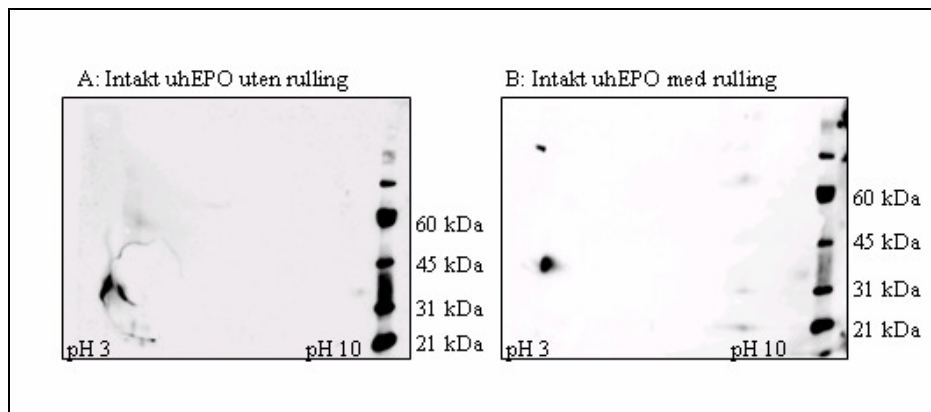


Figur 4.2: 2D elektroforese (A og B) og isoelektrisk fokusering (C og D) av uhEPO-A etterfulgt av immunoblotting.

- A) Intakt uhEPO-A (6,7 ng), 5 sekunders eksponeringstid. Dette er egnet mengde påsatt protein.
- B) Intakt uhEPO-A (40,3 ng), 10 sekunders eksponeringstid. For mye påsatt prøve gir et bilde det ikke går an å beregne kvantitativt på selv ved kort eksponeringstid.
- C) Intakt uhEPO-A (6,7 ng), 10 sekunders eksponeringstid. En eksponeringstid på 10 sekunder gir fine bånd på denne kjøringen.
- D) Intakt uhEPO-A (6,7 ng), 30 minutters eksponeringstid. En eksponeringstid på 30 minutter gir i denne kjøringen alt for sterk intensitet på båndene slik at de flyter inn i hverandre. Videre kvantitativ beregning er ikke mulig.

Elektroblottingen

I rutineanalysen for deteksjon av rhEPO i urin brukes det en rulle oppå filterpapirbunkene for å fjerne eventuelle luftbobler. Det ble observert bobledannelse i bildene etter våtblottingen i XCell II™ Blot Module i XCell SureLock™. Ved å bruke en rulle oppå filterpapirbunkene før blottingen ble problemet redusert (Figur 4.3) og dette ble gjort i alle senere forsøk.



Figur 4.3: 2D elektroforese av uHEPO på 7 cm lange IPG-strips, pH 3-10, etterfulgt av immunoblotting. Molekylvektstandarden vises til høyre i bildene.

- A) Intakt uHEPO (0,56 ng). Det er ikke brukt en rulle oppå filterpapirbunkene før elektroblottingen, noe som har resultert i bobledannelse og et bilde som ikke kan brukes.
- B) Intakt uHEPO (0,56 ng). Etter bruk av en rulle oppå filterpapirbunkene før elektroblottingen oppnås et bilde uten bobledannelse.

Krysseskjema

Det ble laget et detaljert krysseskjema for prosedyren slik at ulike operatører skal kunne utføre prosedyren likt.

Krysseskjema for todimensjonal gelelektroforese av erythropoietin i BioRad Protean IEF Cell (BioRad) og XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen)

Svelling av IPG-strips over natt

1. Prøve og rehydreringsbuffer tilsatt DTT (7 mg / 2,5 ml) blandes og legges i et spor i svellekaret (Totalt prøvevolum; 7 cm strips: 125 µl, 11 cm strips: 200 µl).
2. Fjern plastikken oppå IPG-gelen, klipp av overskuddet på plastikkbunnen på anode(+)-siden og legg stripsen oppå prøveløsningen med gelen ned.
3. Dekkes med coverfluid.
4. Svelles over natt i romtemperatur, gjerne beskyttet mot lys.
5. Stripsene kan legges i rør med plastikken ned og fryses før 1. dimensjon.

1. dimensjon

1. Små elektrodepapirbiter fuktes, hver med 10 μ l vann (MilliQ), og legges en på hver side oppå elektrodene i 1. dimensjonskaret.
2. Stripsen legges med gelen ned slik at gelen ligger over elektrodene på begge sidene (NB + mot + og - mot -). Vær nøye med å få med mest mulig av gelen på anode (+)-siden fordi her samles proteinene av interesse siden de er negativt ladet. En kan heller miste litt av gelen på katode (-)-siden. (Proteinene på utsiden av elektrodene mistes).
3. Dekkes med coverfluid.
4. Lokket settes på, karet settes ned i 1. dimensjons-apparatet.
5. Programmeres etter lengden på stripsene (se Tabell 3.1) og kjøres programmet ut (3,5-4,5 timer).
6. Stripsene kan legges i rør med plastikken ned og fryses før 2. dimensjon.

2. dimensjon

1. Stripsene equilibreres i 2 x 15 minutter i 2,5 ml equilibreringsbuffer tilsatt henholdsvis 25 mg DTT og 28 mg iodoacetamid (NB samme rør med iodoacetamid brukes til begge strips hvis 2 strips kjøres samtidig).
2. Overskuddet på plastikkbunnen på katode(-)-siden klippes av før stripsen legges i IPG-sporet på gelen med katode(-)-siden mot standardbrønnen.
3. 0,5 % agaroseløsning med BFB (ca 75 °C) fylles på oppå stripsen.
4. Sett gelen over i 2. dimensjonskaret med gelsiden inn mot midten slik at den kommer i kontakt med anodebufferen. Buffer inni; MES/MOPS elektroforesebuffer (Invitrogen) med 500 μ l antioksidant (Invitrogen) i 200 ml. Buffer utenpå; MES/MOPS elektroforesebuffer.
5. Tilsett molekylvektmarkør i molekylvektmarkørbrønnen.
6. Kjøres i 20 minutter ved 100 V, deretter ved 200 V (Total tid 70-90 minutter).

4.2 KARAKTERISERING AV HUMANT ERYTHROPOIETIN

4.2.1 Deglykosylering av humant erythropoietin og analyse på SDS-PAGE

Rekombinant humant EPO har identisk aminosyresekvens som det naturlige hormonet. rhEPO produseres for det meste i CHO-celler. Ulike vertsceller gir opphav til ulike posttranslasjonelle modifikasjoner, deriblant glykosylering og eventuell påheking av andre strukturer. For å studere forskjeller i ladning mellom humant og rekombinant EPO, ble proteinene behandlet med ulike enzymer: sialidase, N-glykanase, O-glycosidase, β -galactosidase og β -N-acetyl-hexosaminidase.

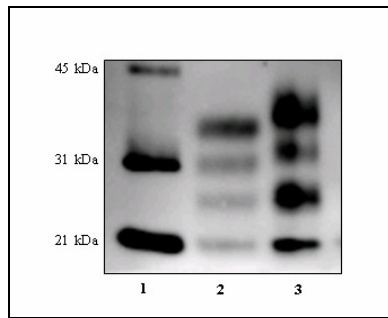
N-glykanasebehandling av humant erythropoietin

Omtrent 40 % av molekylvekten til intakt hEPO er oligosakkaridstrukturer. Tre steder på proteinkjeden har aminosyren asparagin en oligosakkaridstruktur knyttet til seg. Disse N-bundne sukkerene utgjør mesteparten av oligosakkaridstrukturene til hEPO.

rhEPO og uhEPO ble behandlet med N-glykanase (PNGase F) i tre ulike konsentrasjoner, 0,01, 0,02 og 0,08 U/ μ l. For å finne den mest gunstige inkuberingstiden ble fraksjoner tatt ut ved tiden 0 minutter, 20 minutter, 2 timer, 1 døgn og 2 døgn. Enzymet viste seg veldig effektivt, det ble ved hjelp av SDS-PAGE observert en størrelsesforskjell mellom spaltet og intakt protein allerede på 0-prøven i 0,01 U/ μ l-spaltingen. De optimale forholdene for total N-deglykosylering var inkubering med 0,01 U/ μ l N-glykanase ved 37 °C over natt.

Ved ufullstendig spalting med N-glykanase ble det vist at uhEPO har lavere molekylvekt enn rhEPO når proteinene har ett, to eller tre N-bundne sukkerer knyttet til seg.

Størrelsesforskjellen blir mindre jo flere sukkerer som er spaltet av, og i totalt N-deglykosylert form har de to lik størrelse (Figur 4.4). Det ble også observert at rhEPO lettere utsettes for N-glykanasespalting enn uhEPO.



Figur 4.4: SDS-PAGE av delvis N-deglykosylert uhEPO og rhEPO etterfulgt av immunoblotting. Spor 1: molekylvektstandard, spor 2: uhEPO behandlet med N-glykanase i 20 minutter (0,3 ng), spor 3: intakt rhEPO (0,25 ng) og rhEPO behandlet med N-glykanase i 20 minutter (0,5 ng).

Sialidasebehandling av humant erytropoietin

De vanligste terminale monosakkaridene på glykanene til mammalske glykoproteiner er sialinsyrer. Sialinsyrene er negativt ladet ved fysiologisk pH og bidrar dermed til både masse og ladning hos glykoproteinene [32]. uhEPO og rhEPO ble inkubert med sialidase for å fjerne sialinsyrene ytterst på oligosakkaridstrukturene.

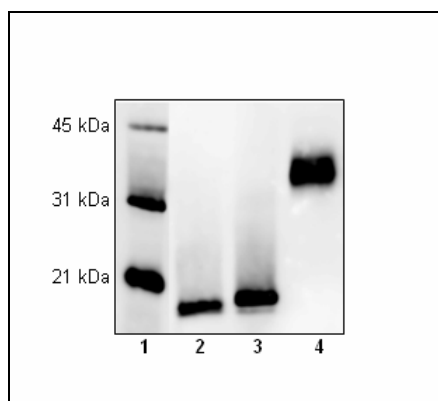
To ulike sialidaser ble prøvet ut, en som spalter α 2-3- og 2-8-bindinger og en som spalter α 2-6-bindinger i tillegg. Endogent EPO inneholder α 2-3- og 2-6-bundne sialinsyrer, mens rekombinant EPO kun har sialinsyrer α 2-3-bundet. For å kunne benytte den samme sialidasen på begge typene hEPO ble det bestemt å bruke sialidasen som spalter α 2-3- og 2-6-bindinger til videre forsøk. For å sikre optimale inkuberingsforhold ble fraksjoner tatt ut etter ulike tidsintervall (0 minutter, 2 timer, 1 døgn og 2 døgn) og analysert på SDS-PAGE og IEF etterfulgt av immunoblotting. Ett døgn så ut til å være tilstrekkelig inkuberingstid og denne inkuberingstiden ble dermed valgt i videre forsøk. Sialidasebehandlet hEPO ble analysert på SDS-PAGE, IEF og 2D elektroforese etterfulgt av elektroblotting og immunodeteksjon.

O-glycosidasebehandling av humant erytropoietin

For å studere forskjellen mellom proteinkjedene til rhEPO og uhEPO, ble N-deglykosylert protein behandlet med O-glycosidase. Dette enzymet spalter av O-sukkere på glykoproteiner som allerede er desialisert ved hjelp av en sialidase.

Det ble forsøkt å spalte hEPO med N-glykanase, sialidase og O-glycosidase samtidig. Dette gav samme resultat som ved spalting av ett og ett trinn og ble benyttet i senere forsøk hvor hensikten kun var å se på totalt deglykosylert hEPO. Analysering av N-glykanase-, sialidase- og O-glycosidasebehandlet hEPO på SDS-PAGE viste en lengre vandring i gelen enn N-

glykanasebehandlet hEPO, noe som altså betyr en mindre molekylmasse. Figur 4.5 viser resultatene for rhEPO. Enzymbehandling av uhEPO gav tilsvarende resultater på SDS-PAGE.



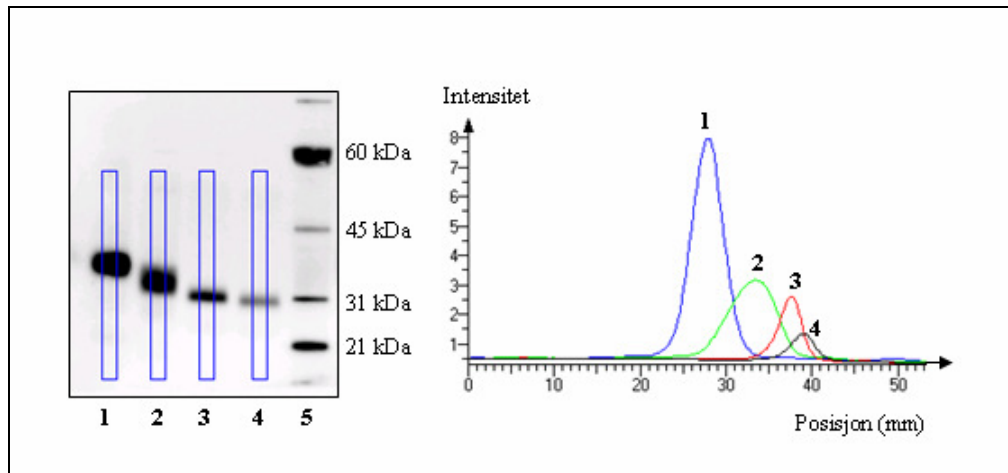
Figur 4.5: SDS-PAGE av rhEPO etterfulgt av immunoblotting. Spor 1: molekylvektstandard, spor 2: rhEPO behandlet med N-glykanase, sialidase og O-glycosidase (0,5 ng), spor 3: rhEPO behandlet med N-glykanase (0,5 ng), spor 4: intakt rhEPO (0,5 ng). Legg merke til dobbeltbåndet i spor 3 hvor båndet med høyest molekylmasse tilsvarer totalt N-deglykosylert rhEPO og båndet med lavest molekylmasse tilsvarer totalt deglykosylert rhEPO, det vil si helt uten N- og O-sukker.

Ved siden av O-glycosidasebehandling ble det forsøkt å spalte av EPOs O-bundne sukker ved β -eliminasjon under milde alkaliske betingelser. Dette fungerte ikke ved noen av inkuberingstidene som ble prøvet ut.

β -galactosidase- og β -N-acetyl-hexosaminidasebehandling av humant erythropoietin

For å avdekke eventuelt på hvilke ledd i oligosakkaridstrukturene ekstra ladninger sitter på uhEPO, ble ett og ett monosakkarid spaltet av fra oligosakkaridstrukturene. Innenfor sialinsyrene sitter β -D-galaktose og deretter β -D-N-acetylglukosamin som ble spaltet av med henholdsvis β -galactosidase og β -N-acetyl-hexosaminidase.

Spaltingene ble analysert for størrelsesendring på SDS-PAGE etterfulgt av elektroblotting og immunodeteksjon før videre analyse på 2D elektroforese. Ved en slik trinnvis spalting blir det veldig liten størrelsesforskjell fra trinn til trinn. Analyse i programmet Aida gir oss en bekreftelse på at spaltingen har foregått ved at intensitetstoppene flytter seg i posisjon (graf i Figur 4.6). Proteinbåndene blir svakere og svakere da tapet av protein økes ved flere trinn i prosedyren (Figur 4.6).



Figur 4.6: SDS-PAGE av uhEPO etterfulgt av immunoblotting og analysering i AIDA. Spor 1: Intakt uhEPO (0,28 ng), spor 2: uhEPO behandlet med sialidase (0,28 ng), spor 3: uhEPO behandlet med sialidase og β -galactosidase (0,28 ng), spor 4: uhEPO behandlet med sialidase, β -galactosidase og β -N-acetyl-hexosaminidase (0,28 ng), spor 5: molekylvektstandard. Ved analyse i Aida fås et bilde på toppenes intensitet i forhold til posisjon. Dette gir en bekreftelse på at spaltingen har foregått.

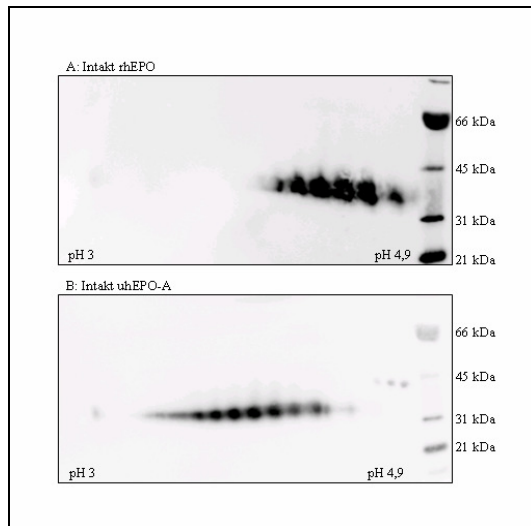
4.2.2 Lokalisering av ukjente negative ladninger på human urin erythropoietin

Det er kjent at rhEPO har mindre negative ladninger enn det naturlige hormonet [35]. Dette kan observeres etter isoelektrisk fokusering og immunoblotting. Ved hjelp av 2D elektroforese var det ønskelig å bestemme om de ekstra negative ladningene på uhEPO er lokalisert på proteinet eller på sukkeret og eventuelt hvilke monosakkarider de er koblet til.

Sammenlikning av de intakte formene av hEPO

For å få en oversikt over hvor de intakte proteinene ligger i pI ble det kjørt en 2D elektroforese etterfulgt av immunodeteksjon. Det ble brukt strips med smale pH-gradienter i et lavt pH-område for å se flest mulig av glykoformene.

I tråd med tidligere forskning [35, 44, 72] ble EPO fra human urin funnet å være surere og ha en lavere molekylmasse enn det rekombinante proteinet (Figur 4.7 A og B).



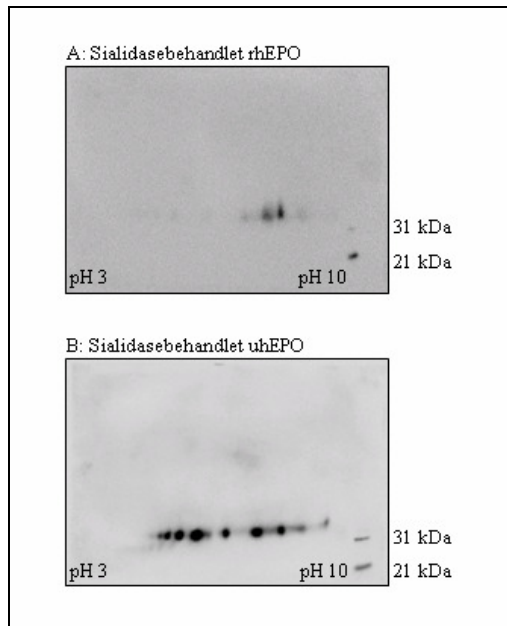
Figur 4.7: 2D elektroforese av hEPO på 11 cm strips pH 3-6, klippet til 7 cm før 2. dimensjon, etterfulgt av immunoblotting. Molekylvektstandarden er til høyre i bildene.

- A) Intakt rhEPO (1 ng).
- B) Intakt uhEPO-A (6,7 ng).

11 cm stripsene som gav et pH-intervall på 3-4,9 ved klipping til 7 cm fungerte godt når formålet var å visualisere flest mulig av de intakte proteinenes glykoformer. Ved 2D elektroforese av enzymbehandlet hEPO blir dette pH-intervallet for smalt da proteinene vil forflytte seg mot det basiske pH-området med en gang ladninger fjernes. Det ble derfor benyttet strips med bredere pH-intervall på enzymbehandlet hEPO.

Sialidasebehandling av hEPO og analysering ved 2D elektroforese

Foruten sialinsyrene bidrar ingen andre monosakkarider til ladning på rekombinant humant EPO [33]. Dette betyr at desialisert rhEPO i teorien skal gi opphav til en spott etter analysering på 2D elektroforese, med pI lik proteinkjedens pI, ca 8,5 [73]. Ved analysering av rhEPO og uhEPO ved 2D elektroforese og immunoblotting ble det sett på ladningsforskjeller etter sialidasebehandling.



Figur 4.8: 2D elektroforese av hEPO på IPG-strips med pH-intervall 3-10 etterfulgt av immunoblotting med dobbeltblotting.

Sammenlikning av sialidasebehandlet uhEPO og rhEPO.

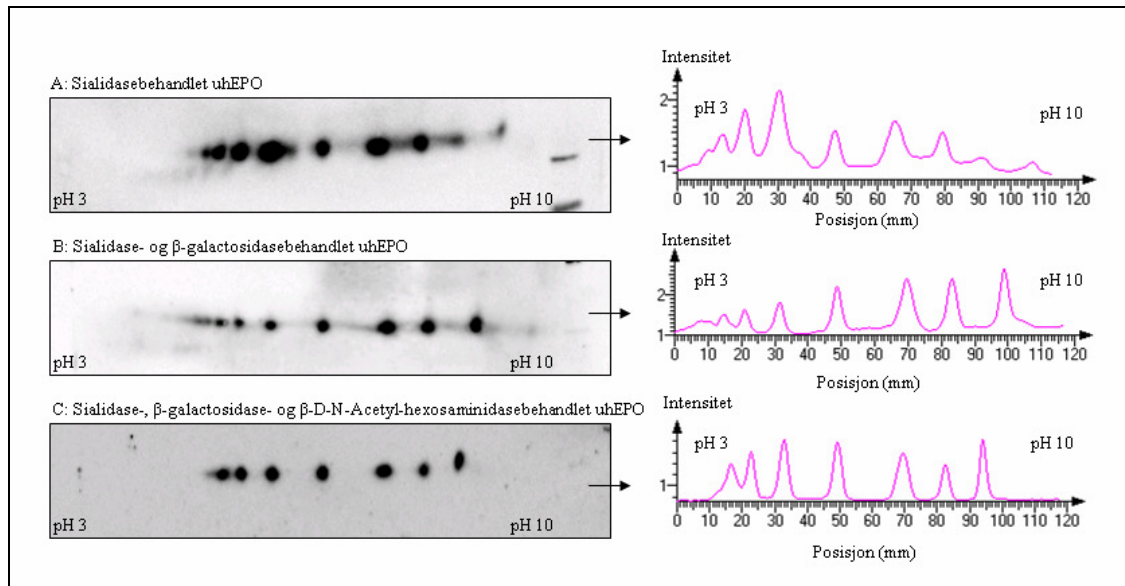
- A) rhEPO behandlet med sialidase (1 ng).
- B) uhEPO behandlet med sialidase (0,56 ng).

Det ble konstatert at det var vanskelig å spalte av alle sialinsyrene på rhEPO. Proteinene gav opphav til to spotter etter 2D elektroforese. Likevel ble forskjellen fra uhEPO observert å være stor (Figur 4.8). Sialidasebehandlet uhEPO ble sett som åtte glykoformer i 2D-diagrammet og glykoformen med minst ladning (lengst mot pH 10) har lavest intensitet.

Trinnvis spalting av oligosakkaridstrukturene på uhEPO

For å avdekke eventuelle påhekte grupper på N-glykanene som bidrar til uhEPOs totale ladning ble ett og ett monosakkarid spaltet av og de ulike prøvene analysert ved 2D elektroforese. Programvaren Aida ble brukt til å sammenlikne intensiteten av spottene i de ulike spaltingsproduktene.

Spottene varierer noe med hensyn på intensitet fra en kjøring til neste. Det er derfor erfart at det er viktig med mange paralleller og at det kan ikke trekkes bastante konklusjoner av få kjøringene. 2D elektroforesen er repetert minst tre ganger for hver spalting. Det mest representative bildet er plukket ut for hver spalting og sammenliknet med resten av spaltingene.



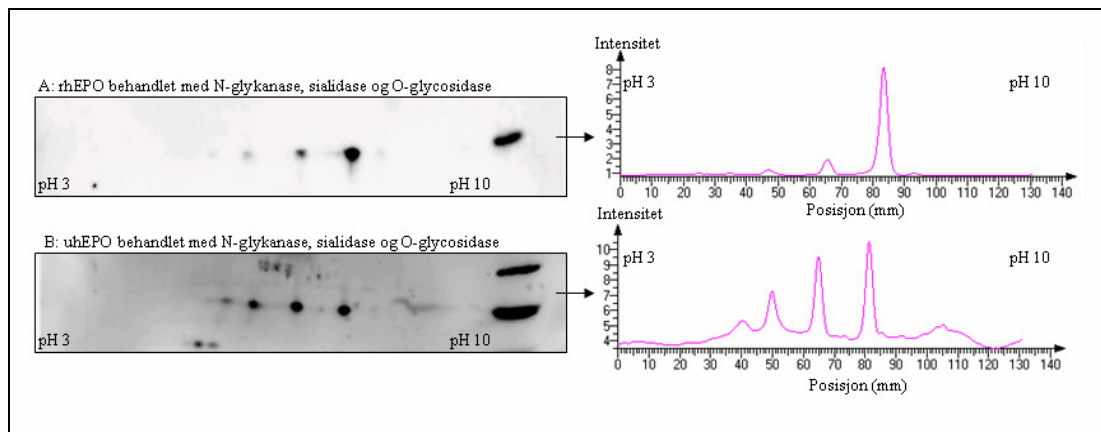
Figur 4.9: 2D elektroforese av ulike uhEPO-spaltninger på IPG-strips med pH-intervall 3-10 etterfulgt av immunoblotting med dobbeltblotting og analyse i Aida. Sammenlikning av uhEPO med ulikt antall monosakkarider spaltet av.

- A) uhEPO behandlet med sialidase (0,56 ng).
- B) uhEPO behandlet med sialidase og β -galactosidase (0,57 ng).
- C) uhEPO behandlet med sialidase, β -galactosidase og β -N-acetyl-hexosaminidase (0,60 ng).

Størrelsesendringen som viste at enzymenes spaltninger på uhEPO har fungert, ble bekreftet på SDS-PAGE (Figur 4.6). Ved analysen i Aida etter 2D elektroforese ble det sett på toppenes relative intensitet (Figur 4.9). Etter avspaltning av galaktoseenhetene med β -galactosidase ser tyngdepunktet på spottene ut til å forskyve seg mot mer basisk pH (Figur 4.9 A og B). Videre behandling av uhEPO med β -N-acetyl-hexosaminidase og fjerning av β -D-N-acetylglukosamin gav ingen signifikant endring i spottenes relative intensitet (Figur 4.9 B og C).

Total deglykosylering av hEPO

For å avdekke eventuelle ladningsforskjeller mellom proteinkjedene i rhEPO og uhEPO ble glykoproteinene behandlet med N-glykanase, sialidase og O-glycosidase og analysert ved 2D elektroforese og immunoblotting. Totalt deglykosylert rhEPO består kun av en glykoform ettersom sialinsyrene er eneste bidrag til ladning utover aminosyrene. I 2D-diagrammet ble det observert en spott i tillegg til hovedspotten med et intensitetsforhold på 1:4 (Figur 4.10 A). uhEPO viste to spotter ved samme pI som rhEPO, men med intensitetsforhold omtrent 1:1. For uhEPO vises i tillegg en spott ved lavere pI med litt lavere intensitet enn de to andre spottene og en veldig svak spott ved enda lavere pI (Figur 4.10 B).



Figur 4.10: 2D elektroforese av hEPO på IPG-strips med pH-intervall 3-10 etterfulgt av immunoblotting og analyse i Aida.

Sammenlikning av de totalt deglykosylerte formene av hEPO.

- A) rhEPO behandlet med N-glykanase, sialidase og O-glycosidase (1 ng).
- B) uhEPO behandlet med N-glykanase, sialidase og O-glycosidase (0,56 ng).

4.2.3 Metoder for påvisning av fosfatgrupper

En av de viktigste reguleringsmekanismene i mammalske celler er proteinfosforylering. Enzymene involvert er proteinkinaser og -fosfataser som henholdsvis hekter på og spalter av fosfatgrupper på proteiner. Fosfatgrupper bidrar til økt negativ ladning og molekylmasse for proteinet, noe som kan føre til endringer i blant annet aktivitet, konformasjon og interaksjon med andre proteiner [74]. Innledende forsøk tyder på at fosfatgrupper kan bidra til den ekstra negative ladningen uhEPO har i forhold til rhEPO [75]. Det finnes ulike analytiske metoder for påvisning av fosfatgrupper. For å undersøke om fosfatgrupper kan påvises på uhEPO ble oppkonsentrert urin fra anemipasienter analysert ved tre ulike metoder.

Antistoffer mot fosfatgrupper bundet til aminosyren serin

Fosfatgrupper kan i teorien være bundet til flere aminosyrer i et protein. Det mest vanlige er serinfosforylering, etterfulgt av treonin. Sekvensen til hEPO ble analysert i NetPhos 2 Server [76], et program som angir sannsynligheten for serin-, tyrosin- og treoninfosforyleringer i eukaryote proteiner. Resultatet var at det mest sannsynlige fosforyleringspunktet er aminosyren serin. Deglykosylert uhEPO ble analysert ved 2D elektroforese og immunoblotting og et polyklonalt antistoff mot fosfatgrupper knyttet til serin ble benyttet som primært antistoff (Tabell 3.2).

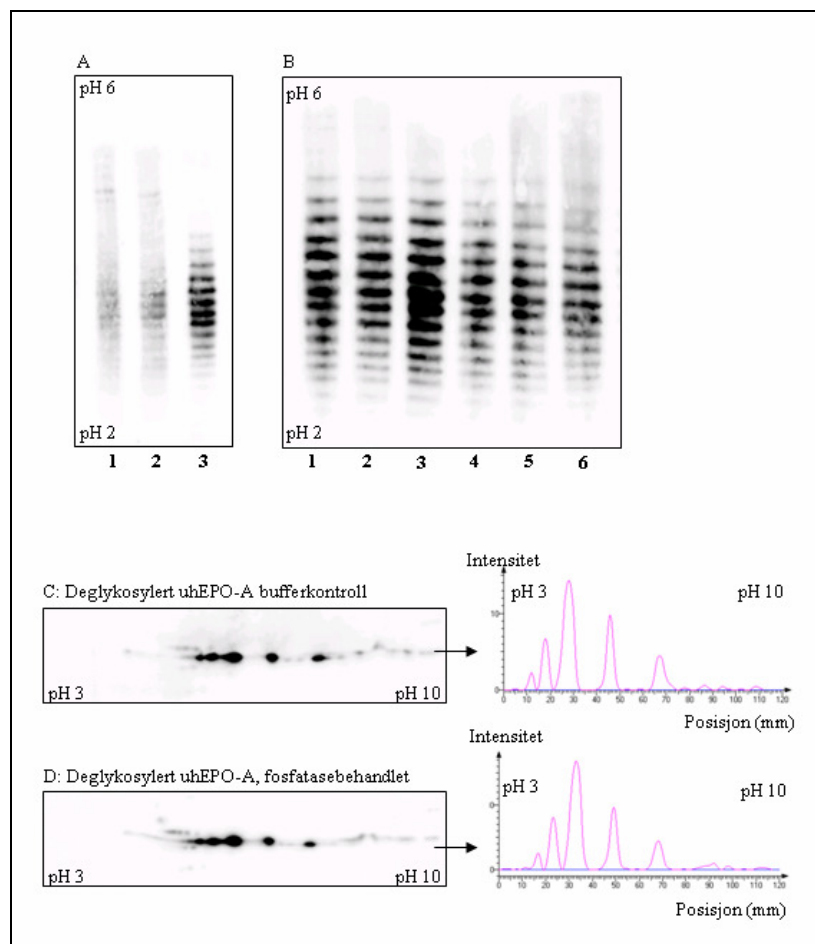
Det ble ikke observert noen signaler ved fremkalling i CCD-kameraet ved noen av de to parallellene som ble utført.

Behandling av uhEPO med λ -PPase

Lambda Protein Fosfatase (λ -PPase) er en protein fosfatase som spalter av fosfatgrupper koblet til aminosyrene serin, treonin og tyrosin. Ved sammenlikning av ladningsmønsteret før og etter spalting med fosfatasen ble det sett på sannsynligheten for at uhEPO har fosfatgrupper koblet til proteinkjeden. Prøvene ble analysert både ved isoelektrisk fokusering og 2D elektroforese etterfulgt av immunoblotting. Erythropoietin ble deglykosylert før behandling med λ -PPase slik at sukkerstrukturene ikke skulle hindre enzymet i å nå frem til fosfatgruppene. Ved isoelektrisk fokusering ble det brukt intakt EPO da proteinet ellers ville havnet utenfor gelens pH-gradient på 2-6.

Det var vanskelig å få til skikkelige spaltinger med λ -PPase. Til tross for at det ble benyttet bufferen som fulgte med enzymet, ble det observert at denne inneholdt proteaser. Resultatet var at store deler av proteinet ble ødelagt og båndene etter IEF ble dratt utover (Figur 4.11 A). En ny buffer måtte derfor bestilles fra produsent underveis.

Figur 4.11 B viser et forsøk med λ -PPase-spalting i 2 ulike buffere; bufferen som fulgte med enzymet og en 50 mM natriumfosfatbuffer pH 7,5 med 10 mM EDTA og 0,02 % NaN_3 . Det er dessuten tatt med tre kontroller, en bufferkontroll for hver buffer samt en temperaturkontroll; uhEPO inkubert ved samme temperatur i samme tid som de andre spaltingene. Det er så små forskjeller i surhetsgrad mellom de ulike prøvene at det er vanskelig å se det visuelt. Ved bruk av Aida til utregning av surhetsgraden (ikke vist) fås resultatet at intakt uhEPO er den minst sure prøven av alle. Prøvene i bufferkontrollene er tilnærmet like sine respektive fosfatasebehandlede prøver i surhetsgrad, men prøven i natriumfosfatbufferen er nærmest intakt uhEPO med hensyn på ladning. Intakt uhEPO inkubert ved 30 °C i 6 timer (temperaturkontrollen) er surest av alle prøvene, men veldig lik λ -PPase-bufferkontrollen og tilhørende λ -PPase-spalting.



Figur 4.11: uhEPO-A. Prøven er behandlet med fosfatase i ulike buffere og analysert ved isoelektrisk fokusering i gel (A og B) og 2D elektroforese (C og D) etterfulgt av immunoblotting.

- A) Spor 1: uhEPO-A behandlet med Lambda Protein Fosfatase (λ -PPase) i medfølgende buffer ved 30 °C i 18 timer (6,7 ng), spor 2: uhEPO-A inkubert i Lambda Protein Fosfatase-buffere ved 30 °C i 18 timer (6,7 ng), spor 3: Intakt uhEPO-A (6,7 ng).
- B) Spor 1: Intakt uhEPO-A (6,7 ng), spor 2: uhEPO-A behandlet med λ -PPase i 50 mM natriumfosfatbuffer pH 7,5 med 10 mM EDTA og 0,02 % NaN_3 ved 30 °C i 6 timer (6,7 ng), spor 3: uhEPO-A inkubert i 50 mM natriumfosfatbuffer pH 7,5 med 10 mM EDTA og 0,02 % NaN_3 ved 30 °C i 6 timer (6,7 ng), spor 4: uhEPO-A inkubert i 6 timer ved 30 °C (6,7 ng), spor 5: uhEPO-A behandlet med Lambda Protein Fosfatase (λ -PPase) i medfølgende buffer ved 30 °C i 6 timer (6,7 ng), spor 6: uhEPO-A inkubert i Lambda Protein Fosfatase-buffere ved 30 °C i 6 timer (6,7 ng).
- C) Deglykosylert uhEPO-A inkubert i Lambda Protein Fosfatase-buffere ved 30 °C i 6 timer (6,7 ng).
- D) Deglykosylert uhEPO-A behandlet med Lambda Protein Fosfatase (λ -PPase) i medfølgende buffer ved 30 °C i 6 timer (6,7 ng).

Deglykosylert uhEPO med og uten λ -PPase-behandling gav tilnærmet identiske bilder ved 2D elektroforese (Figur 4.11 C og D med tilhørende grafer). Spottenes intensitet i forhold til hverandre er meget like for de to prøvene.

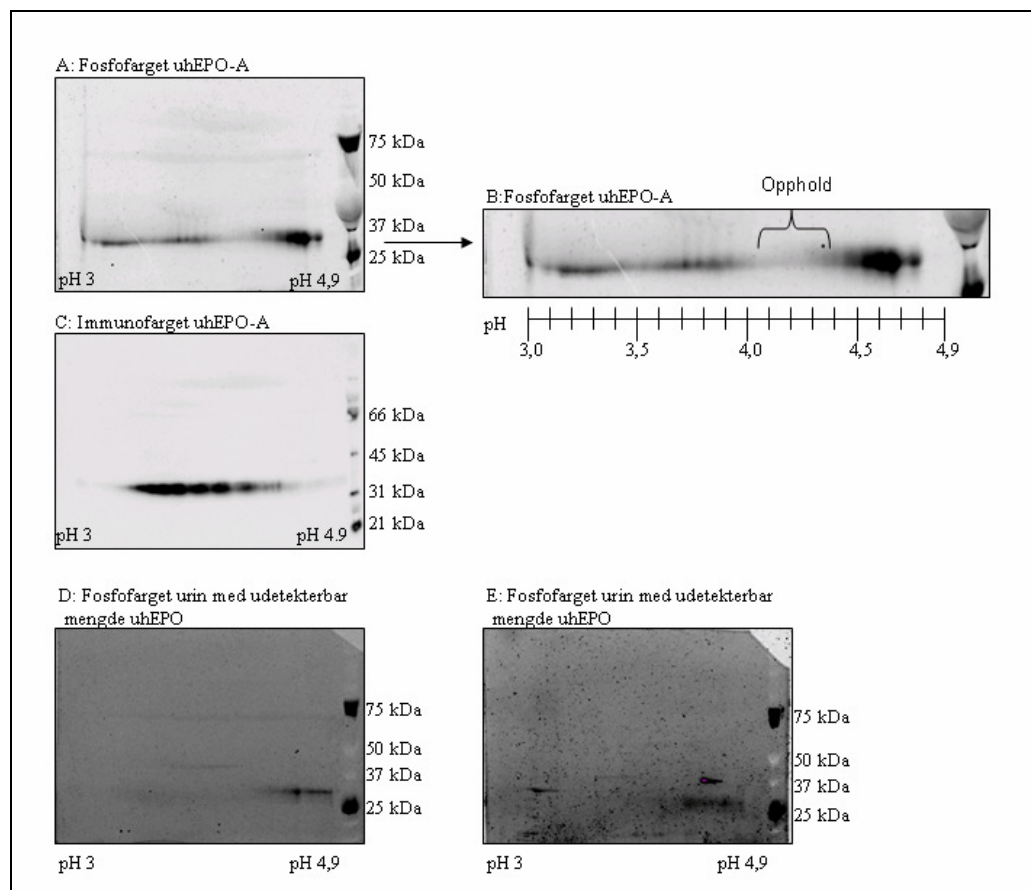
Farging av fosfatgrupper i gel

Gelfargen Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain inneholder et fluorescerende stoff som gjenkjenner fosfatgrupper bundet til peptider og proteiner direkte i gel. Intakt uhEPO fra en anemipasient ble derfor analysert ved 2D elektroforese etterfulgt av fosfofarging av gelen. Ved siden av alle fosfofargingene ble det kjørt en parallell 2D elektroforese hvor elektroblotting og immunodeteksjon bekreftet hEPOs plassering i gelen.

Det benyttes ulike standarder ved deteksjon i gel og på membran. Ved kjemiluminescensedeteksjon ble det benyttet to ulike standarder med litt ulik størrelse på proteinene, se 3.3.3, for å kunne sammenlikne best mulig med standarden brukt ved fluorescens. Ved å plote relativ vandring mot logaritmen til molekylvekten av de ulike proteinene i molekylvektstandarden fås en rett linje og proteinets molekylvekt kan bestemmes.

Fosfofarging av uhEPO etter 2D elektroforese på 11 cm strips med pH-intervall 3-4,9 etter klipping til 7 cm ble utført to ganger. Det ble observert spotter som ble regnet ut å ha en størrelse på 30-32 kDa. Spottene med lavest intensitet har en pI mellom 3,6 og 3,9, mens spottene med høyest intensitet har en pI mellom 4,5 og 4,8. Det er altså et pH-område mellom disse helt fri for spotter.

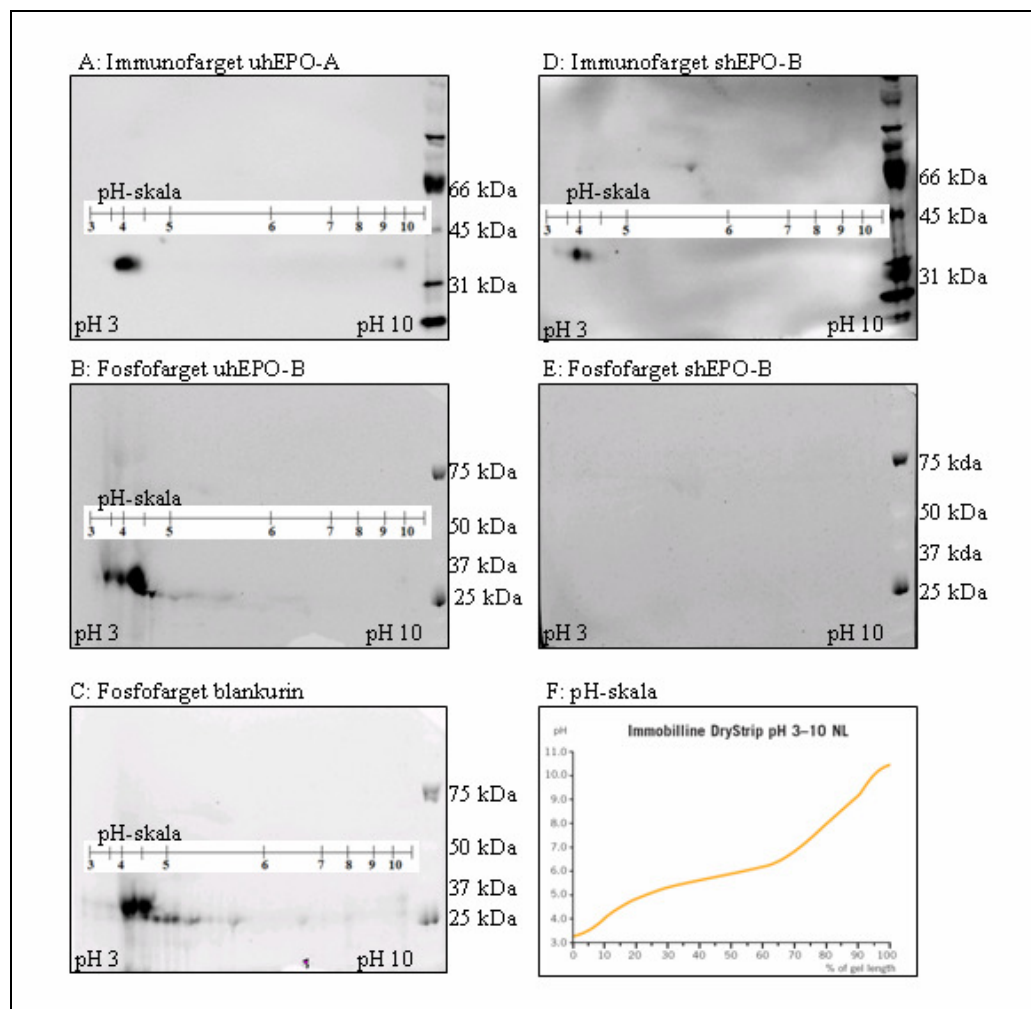
For å ha en kontroll på eventuelle andre fosforylerte molekyler i urinen som kan gi opphav til signaler etter fosfofarging, ble oppkonsentrerte urinprøver fra friske individer (person C og D) analysert ved fosfofarging i gel etter 2D elektroforese. Mengdene påsatt prøve tilsvarer påsatt mengde av anemipasientenes oppkonsentrerte urin. Prøvene hadde udetekterbare mengder uhEPO ved IEF og immunofarging, men etter fosfofarging ble det observert signaler ved størrelse ca 30 kDa og pI ca 4,5-4,9 (Figur 4.12 D og E).



Figur 4.12: uEPO-A og urinprøver fra to personer med udetekterbare mengder uEPO. Prøvene er analysert ved 2D elektroforese etterfulgt av fosfofarging av gelen (A, B, D og E) og elektroblotting og immunodeteksjon (C).

- A) Intakt uEPO-A (134 ng) kjørt på 11 cm strips pH 3-6, klippet til 7 cm før 2. dimensjon.
- B) Intakt uEPO-A (134 ng) kjørt på 11 cm strips pH 3-6, klippet til 7 cm før 2. dimensjon, utklipp fra figur A.
- C) Intakt uEPO-A (6,7 ng) kjørt på 11 cm strips pH 3-6, klippet til 7 cm før 2. dimensjon.
- D) Oppkonsentrert urin fra person C med udetekterbare mengder uEPO ved immunofarging etter IEF (8 µl).
- E) Oppkonsentrert urin fra person D med udetekterbare mengder uEPO ved immunofarging etter IEF (10 µl).

For å sammenlikne EPO fra humant serum og urin ble det benyttet prøver fra anemipasient B. Erythropoietin ble ekstrahert fra serum ved bruk av superparamagnetiske kuler som forklart under 3.2.



Figur 4.13: uhEPO-A og -B og shEPO-B samt urin fra en frisk person. Prøvene er analysert ved 2D elektroforese pH 3-10, etterfulgt av fosfofarging av gelen (B, C og E) og elektroblotting og immunodeteksjon (A og D).

- A) Intakt uhEPO-A (1,3 ng).
- B) Intakt uhEPO-B (26,8 ng).
- C) Urin fra en frisk person, person C (20 µl). Urinen inneholder så lite EPO at immunofarging etter IEF ikke detekterer det som er tilstede
- D) Intakt shEPO-B (1 ng).
- E) Intakt shEPO-B (36 ng).
- F) Oversikt over pH-skalaen på de 7 cm lange IPG-stripsene med ikke-lineært pH-intervall pH 3-10.

Ved fosfofarging av uhEPO-B ble det observert signaler i pH-området 3,5 til ca 4,8. Det ble observert to svake spotter i det laveste pH-området og en spott med høyere intensitet ved høyere pH (Figur 4.13 B). Fosfofarging av uhEPO-A gav liknende bilder som dette ved tre 2D kjøringer (ikke vist). Ved immunofarging av uhEPO sees en spott med pI ca 3,5-4, som bekrefter uhEPOs posisjon i 2D-diagrammet (Figur 4.13 A). Fosfofarging av shEPO-B gav ingen signaler ved fremkalling i CCD-kameraet (Figur 4.13 E), selv om immunofargingen av samme prøve bekreftet at shEPO-B var tilstede (Figur 4.13 D).

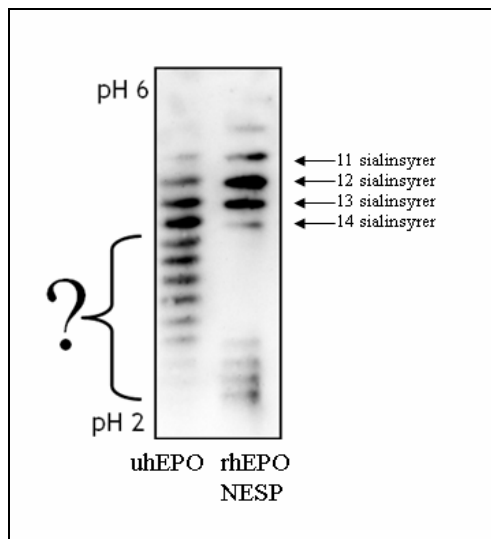
Urinprøver fra friske individer med udetekterbare mengder uhEPO ble igjen analysert for å ha en kontroll på hvilke signaler etter fosfofarging som ikke kan tilskrives uhEPO. Ved IEF og immunofarging ble ingen signaler observert, men ved fosfofarging av samme prøve ble det observert en spott ved størrelse ca 28-30 kDa og pI mellom 4 og 5 (Figur 4.13 C).

Det ble utført en 2D elektroforese av rhEPO etterfulgt av fosfofarging hvor ingen signaler ble observert ved fremkalling. Immunofarging av tilsvarende prøve bekreftet rhEPOs størrelse på ca 38 kDa (ikke vist). Det ble videre kjørt to paralleller av uhEPO-A, med og uten tilsatt rhEPO, på 2D elektroforese etterfulgt av fosfofarging av gelene. Dette gav helt like bilder for parallellene (ikke vist). Bildene var dessuten like de to andre fosfofargingene av uhEPO-A.

5 Diskusjon

5.1 HVOR PÅ ERYTROPOIETINMOLEKYLET ER LADNINGENE BUNDET?

Et av hovedmålene i oppgaven var å bestemme lokaliseringen til de ekstra negative ladningene uhEPO har i forhold til rhEPO. Utover aminosyrenes ladninger har rhEPO produsert i CHO-celler maksimalt 14 negative ladninger på grunn av maksimalt 14 sialinsyrer. uhEPO har en rekke glykoformer som er surere enn dette (Figur 5.1). Årsaken er antakelig at hEPO under sitt opphold i sirkulasjonen får heftet på strukturer som bidrar til glykoproteinets totale ladning.



Figur 5.1: Isoelektrisk fokusering etterfulgt av immunoblotting viser at uhEPO har en rekke glykoformer som er surere enn den sureste glykoformen til rhEPO med 14 sialinsyrer. Spørsmålet er; Hvilke grupper bidrar til de ekstra negative ladningene på uhEPO og hvor er disse lokalisert?

Et sentralt spørsmål er om ladningene er koblet til proteinkjeden eller sukkerstrukturene, eller begge deler. Det var dessuten ønskelig å bestemme hvilke monosakkarider på glykanene de ladde gruppene eventuelt er koblet til.

Muligheten for at ladninger er påkoblet proteinkjeden til uhEPO er lite studert. Teoretisk sett er det mulighet for påheking av ladde grupper på proteinkjeden, både posttranslasjonelt og i elimineringsfasen. Vanlige posttranslasjonelle modifikasjoner av proteiner er acetylering, metylering, amidering, karboksylering, ubiquitinerings og fosforylering [74]. Før

elimineringen av legemidler, får disse ofte påheftet grupper som gjør legemiddelet mer løselig og mindre aktivt (fase 2 metabolisme), slik at det skilles ut av kroppen. Eksempler på fase 2 metabolisme er acetylering, glukuronidering og sulfatering [47]. Når det gjelder ladninger påkoblet sukkerstrukturene er det gjort en del studier på dette, men kun for det rekombinante hormonet. I studiene er det vist at det er muligheter for binding av både fosfat og sulfat på sukkerstrukturene til hEPO [77, 78].

Ved hjelp av SDS-PAGE ble intakt og enzymbehandlet EPO karakterisert med hensyn på størrelse. Det er tidligere vist at intakt rhEPO har en høyere molekylvekt enn uhEPO. Dette ble bekreftet i oppgaven. Det ble videre vist at størrelsesforskjellen mellom disse minsker jo flere N-bundne sukkere som er spaltet av (Figur 4.4). Dette tyder på at størrelsesforskjellen som observeres hos de glykosylerte formene skyldes strukturforskjeller i N-glykanene. Dette er i tråd med funnene til Skibeli *et al.* (2001) [31]. Det er viktig å huske at grupper som eventuelt bidrar med ladning på molekylet ikke nødvendigvis vil utgjøre en størrelsesforskjell som kan detekteres ved hjelp av SDS-PAGE. Ladninger bundet til EPOs proteinkjede kan derfor ikke utelukkes. Ladde grupper som er bundet til en av formene EPO kan være koblet både til sukker og/eller proteindelen av EPO.

Glykoproteiner består av en rekke glykoformer med noe varierende størrelse, noe som fører til at de danner brede proteinbånd ved gelelektroforese. SDS-PAGE etterfulgt av immunoblotting på sialidase-, β -galactosidase- og β -N-acetyl-hexosaminidasespaltet hEPO viste at båndene ble smalere desto flere sukkerenheter som ble spaltet av (Figur 4.6). Dette gir et bilde på mikroheterogeniteten som ligger i oligosakkaridstrukturene. Hvis det kun var sialinsyrene bundet terminalt til sukkerstrukturene som bidro med størrelsheterogeniteten til molekylet ville man forvente at proteinet behandlet med sialidase gav et skarpt bånd ved analyse på SDS-PAGE.

Det ble vist at rhEPO lettere utsettes for spalting med N-glykanase enn uhEPO. I Figur 4.4 er det derfor tilsatt en liten mengde intakt rhEPO i spor 3 da inkubering med PNGase i 20 minutter gir en såpass god spalting at glykoformene med tre N-sukkerer ikke lenger er tilstede. En tilsvarende inkubering for uhEPO viste en jevn fordeling blant de fire båndene. Skibeli *et al.* (2001) viste at shEPO var mer mottakelig for N-glykanasespalting enn rhEPO [31]. Av de tre formene er dermed uhEPO aller minst mottakelig for N-glykanasespalting, etterfulgt av

rhEPO og shEPO respektivt. Årsaken kan være små strukturforskjeller på sukkerene til de ulike EPO-formene som gjør at enzymet i ulik grad kommer til ved spaltingspunktet mellom N-glykanene og proteinkjeden. Ved behandling av rhEPO med N-glykanase ble det observert at enzymet hadde begynt å spalte proteinet allerede i "nullprøven". Til tross for at nullprøven ble lagt i fryser rett etter behandling med N-glykanase får enzymet mulighet til å virke den tiden det tar å preparere prøven, tiden før innfrysning, ved tining og ved prøvepreparering, før prøven påsettes en SDS-PAGE. Prøven er dermed ikke en ekte nullprøve. På bakgrunn av størrelsesforskjellen mellom denne og ubehandlet protein kan det konkluderes med at N-glykanasespaltingen skjer svært hurtig.

rhEPO behandlet med både N-glykanase-, sialidase og O-glycosidase vandret lenger i gelen og har altså lavere molekylvekt enn N-glykanasebehandlet rhEPO. Dette tyder på at O-sukkeret er spaltet av (Figur 4.5). Proteinbåndet har en molekylstørrelse på under 21 kDa, noe som tilsvarer teoretisk molekylmasse på hEPOs proteinkjede, 18 kDa, utregnet fra proteinets cDNA-sekvens [19, 20]. N-glykanasebehandlet rhEPO gir videre et dobbeltbånd på SDS-PAGE (Figur 4.5, spor 3). Det samme observeres for uhEPO (ikke vist). Båndet med høyest molekylmasse tilsvarer N-deglykosylert hEPO med O-sukker koblet til seg, mens båndet med lavest molekylmasse tilsvarer totalt deglykosylert hEPO. Båndet som tilsvarer totalt deglykosylert hEPO er mye svakere enn det andre båndet, men indikerer at en fraksjon av intakt glykoprotein foreligger uten O-sukker koblet til seg.

For å være sikker på at de enzymatiske spaltingene var fullstendige ble SDS-PAGE brukt til analyse av alle fraksjoner før en eventuell 2D elektroforese. SDS-PAGE har den fordelen at flere fraksjoner analyseres i spor ved siden av hverandre slik at en størrelsesendring lett kan påvises. Ved tolkning av 2D-resultater er det helt avgjørende at det med sikkerhet kan fastslås at spaltingen har vært fullstendig. Som et eksempel viste sialidasespaltet rhEPO et bredt bånd i forhold til uhEPO på SDS-PAGE. Båndet til sialidasespaltet rhEPO overlappet med båndet til intakt rhEPO, noe som tydet på en ufullstendig sialidasespalting. Dette ble bekreftet ved 2D elektroforese hvor rhEPO ikke viste seg som én homogen form som er forventet for desialisert rekombinant hormon (Figur 4.8). Teoretisk skal det også i en 2D-gel kunne vurderes om et protein er homogent med hensyn på størrelse. I praksis viser det seg at små størrelsesforskjeller mellom spottene i gelen kan være vanskelig å se. I noen tilfeller kan små forskjeller forveksles med en litt "skjev" elektroforese.

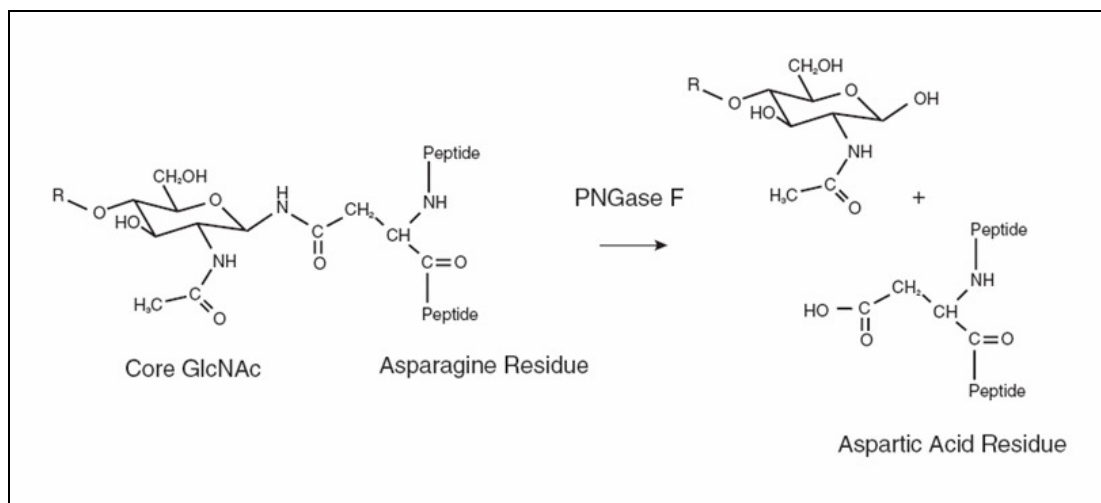
Ved 2D elektroforese av intakt rhEPO ble det vist at de basiske glykoformene har lavere molekylmasse enn de sure formene (Figur 4.7 A). Spottene får gradvis lavere molekylmasse desto mer de nærmer seg basisk pH, og resultatet er en skrå rekke spotter. Dette kan forklares med at de terminale sialinsyrene på oligosakkaridstrukturene er færre jo mer basisk formene er, og at disse bidrar med molekylmasse så vel som ladning på glykoproteinet.

Som tidligere beskrevet var det vanskelig å få til en fullstendig desialisering av rhEPO. Til tross for dette ble forskjellen til uhEPO tydelig observert etter 2D elektroforese (Figur 4.8). Av de åtte glykoformene som ble observert i 2D-diagrammet for sialidasebehandlet uhEPO var andelen av den mest basiske glykoformen lavest. Disse resultatene bekrefter at EPO fra human urin er surere enn det rekombinante hormonet. Det kan spekuleres i om dette skyldes ladde grupper som bindes til proteinet som en merkelapp for utskillelse, eller om det er proteinmolekylene som er surest i utgangspunktet som skilles ut i størst grad. Men når man sammenlikner endogent EPO fra serum og urin, analysert for eksempel på IEF, vil uhEPO ikke bare ha en profil som har sitt tyngdepunkt på en surere side, men ha former med pI lavere enn de sureste formene til shEPO. Dette betyr at uhEPO etter all sannsynlighet har fått ytterligere ladninger festet til seg. Tidligere er det vist at EPO fra humant serum er surere enn rhEPO [31], og at uhEPO er surere enn shEPO igjen [79].

En forskyvning i pI mot basisk område innebærer et protein med mindre negative ladninger. Forsøkene med trinnvis avspalting av monosakkaridene på de N-bundne sukkerene til uhEPO påviste som forventet en slik forskyvning etter inkubering med sialidase, fordi sialinsyrene er negativt ladet. Etter inkubering med β -galactosidase ble det observert en ytterligere forskyvning (Figur 4.9 A og B), noe som tyder på at negativt ladde grupper er koblet til galaktose, siden galaktosemolekylet ikke er ladet i seg selv. Ingen særlig endring i spottenes relative intensitet etter videre inkubering med β -N-acetyl-hexosaminidase tyder på at β -D-N-acetylglukosamin ikke har noen negativt ladde grupper knyttet til seg (Figur 4.9 B og C). Sammenliknes signalmønsteret etter 2D elektroforese for uhEPO spaltet med sialidase, β -galactosidase og β -N-acetyl-hexosaminidase (Figur 4.9 C) med totalt deglykosylert uhEPO (Figur 4.10 B) observeres store forskjeller. Totalt deglykosylert uhEPO har færre glykoformer, noe som viser at negative ladde grupper også er koblet til sukkerstrukturen mellom β -D-N-acetylglukosamin og proteinkjeden, se Figur 3.7. For å bestemme mer nøyaktig hvilket/hvilke sukkermolekyler de negativt ladde gruppene er koblet til, kan det

utføres videre trinnvis deglykosylering av uhEPO etterfulgt av sammenlikning etter 2D elektroforese og immunoblotting.

Ved 2D elektroforese av totalt deglykosylert rhEPO og uhEPO ble det vist henholdsvis 2 og 3 spotter, men ulik tyngdefordeling mellom de to spottene som er felles for deglykosylert rekombinant og naturlig hormon (Figur 4.10). Dette tyder på at det er ladningsforskjeller mellom proteinrygggradene for de to formene. Proteinrygggraden til EPO fra human urin er surere enn den rekombinante formen. Dette viser at grupper med negativ ladning som ikke er tilstede på rhEPO er lokalisert på proteinkjeden til EPO fra human urin. Det ble også observert at både totalt deglykosylert rhEPO og uhEPO har mistet den mest basiske glykoformen som observeres etter sialidasespalting av intakt protein (Figur 4.8 og Figur 4.10). Det kunne forventes at en spott med denne pI'en også var representert når hele sukkerstrukturen var spaltet av. Årsaken til at dette ikke er tilfelle er at det ved fjerning av N-sukkerene ved N-glykanasebehandling skapes en ny negativ ladning ved at asparagin deamineres til aspartat (Figur 5.2).



Figur 5.2: Deaminering av asparagin til aspartat ved behandling av et glykoprotein med N-glykanase (PNGase F) gir opphav til en syregruppe som bidrar til glykoproteinetts totale ladning [32].

5.2 HVILKE GRUPPER GIR DE NEGATIVE LADNINGENE PÅ HUMAN URIN ERYTROPOIETIN?

Det andre hovedmålet i oppgaven var å bestemme hvilke grupper som bidrar til de ekstra negative ladningene på uhEPO, som ikke er tilstede på det rekombinante hormonet. Som nevnt under avsnitt 5.1 er det mange mulige modifiseringer hEPO kan utsettes for i menneskekroppen. De mest sannsynlige gruppene som bidrar til de negative ladningene på uhEPO er sulfat-, fosfat- og karboksylgrupper. I oppgaven er det valgt å undersøke muligheten for at uhEPO er fosforylert. Tre ulike metoder ble benyttet; immunodeteksjon med et antistoff som gjenkjenner fosfatgrupper bundet til serin, spalting med en proteinfosfatase etterfulgt av analysering med hensyn på ladningsendringer, og en gelfarge som detekterer alle fosforylerte proteiner og peptider direkte i gel.

Ved å teste aminosyresekvensen til EPO for mulige fosforyleringsmotiver, ble det funnet at aminosyren serin er det mest sannsynlige punktet for fosforylering. Det ble ikke påvist serinfosforyleringer ved bruk av antistoffer mot fosfatgrupper koblet til serin. Dette kan tyde på at uhEPOs proteinkjede ikke er fosforylert, selv om fosforylering på andre aminosyrer enn serin ikke kan utelukkes etter dette forsøket. Det er også mulig at konsentrasjonen på det primære antistoffet som ble brukt ikke var det optimale selv om anbefalinger fra produsent ble fulgt. Dette kan være årsaken til at eventuelle serinfosforyleringer ikke kunne påvises. På grunn av mangel på tid og et svært dyrt anti-fosfoserin-antistoff, ble fosfofarging i gel prioritert å jobbe med i stedet for titrering av antistoffkonsentrasjon.

Behandling av uhEPO med fosfatase gav ingen forskyvning av glykoproteinets ladning mot det mer basiske i forhold til tilhørende bufferkontroller. Behandling med fosfatase på et protein inneholdende negativt ladde fosfatgrupper ville ha gitt et mindre surt protein. At prøven med intakt uhEPO inkubert ved 30 °C i 6 timer uten verken buffer eller λ -PPase er surere enn intakt uhEPO tatt rett fra -20 °C, tyder på at uhEPO er lite stabil ved 30 °C. En mulig årsak til ekstra negative ladningene på denne prøven kan skyldes at det har skjedd en degradering av glykoformene med minst sukker på. Oligosakkaridstrukturene ser dermed ut til å beskytte proteinet mot temperaturmediert degradering. Prøvene med natriumfosfatbuffer ligger nærmere intakt protein i ladning enn fosfatasebufferprøvene og

temperaturkontrollprøven, noe som kan tyde på at natriumfosfatbufferen til en viss grad beskytter proteinet mot degradering.

For å være sikker på at ikke de store sukkerstrukturene på EPO hindret fosfatasen i å nå fosfatmolekylene, ble enzymet også testet på deglykosylert uhEPO. Tilnærmet identiske bilder og relativ intensitet på spottene etter 2D-elektroforese for deglykosylert uhEPO med og uten λ -PPase-behandling kan tyde på at proteinkjeden ikke har fosfatgrupper koblet til seg. Det er likevel en mulighet at fosfatgrupper på proteinkjeden har blitt spaltet av, men at de bidrar så lite til ladning at forskjellen ikke kan detekteres på en 2D elektroforese. I så fall vil dette bety at ladningsforskjellene i hovedsak skyldes andre ladde grupper enn fosfat. En annen mulighet er at fosfatasen ikke har virket og at eventuelle fosfatgrupper fortsatt er heftet på proteinkjeden etter fosfatasebehandlingen. Det er kjent at fosfataser ofte er vanskelige å jobbe med. Det er sannsynlig å tro at uhEPO er fosforylert, så videre arbeid kunne bestått i å prøve ut ulike fosfataser på uhEPO for å finne en som passer til dette formålet.

Fosfofarging av uhEPO i gel gav sterke signaler, noe som tydelig viser at fosforylerte proteiner/peptider er tilstede. Spottene var lokalisert rundt 30 kDa, noe som stemmer bra med uhEPOs molekylvekt. Ved fosfofargingen av uhEPO-A etter 2D elektroforese på strips med smale pH-gradienter, ble det observert et opphold mellom de to gruppene med spotter (Figur 4.12 A og B). Det er uvisst hvordan eventuelle fosfogrupper er fordelt på uhEPO, men det er sannsynlig at det er en glidende overgang av fosforylering som vil føre til et jevnt mønster av spotter uten opphold. Oppholdet som observeres mellom spottene tyder derfor på at det er to ulike stoffer tilstede. Spottene midt i bildet etter fosfofargingen (Figur 4.12 A og B) har en pI på rundt 3,5-3,9, noe som korrelerer med pI'en til uhEPO ved immunofarging (Figur 4.12 C). Spottene med høyest intensitet ligger ved pI 4,5 og oppover. Ved fosfofarging av urin med udetekterbare mengder uhEPO detekteres kun spotter mellom pI 4,5 og 4,9 (Figur 4.12 D og E). Spotter som korrelerer med uhEPOs størrelse og ladning er som forventet ikke tilstede. Det er derfor stor sannsynlighet for at spottene med pI mellom 3,5 og 3,9 i anemipasient A sin urinprøve er fosforylert uhEPO. Dette viser tydelig at fosfat er en gruppe som bidrar til negativ ladning på uhEPO.

Det er uvisst hvilket fosforylert molekyl i urinen som gir opphav til spottene med pI 4,5-4,9, men det ser ut til å være individuell variasjon i mengden av dette molekylet. Det er en relativt

stor forskjell i intensitet på disse spottene hos de to friske individene med udetekterbare mengde uhEPO (Figur 4.12 D og E).

Fosfofarging av uhEPO-A og B etter 2D elektroforese på strips med brede pH-gradienter, gav en hovedspott med noe høyere pI enn immunofarget uhEPO. I tillegg til hovedspotten observeres spotter med lavere intensitet på noe lavere pI. Fosfofarging av urin fra et friskt individ med udetekterbare mengder uhEPO gav opphav til den samme hovedspotten som sees for uhEPO fra anemipasientene, men ikke spottene med svakere intensitet og lavere pI. Resultatene stemmer overens med det som er sett på stripsene med smale pH-gradienter. Det er imidlertid lettere å se forskjell på uhEPO og det ukjente proteinet på en strips med smalere pH-gradient da de har såpass lik størrelse og pI.

For å være sikker på at ikke strukturer som er tilstede på det rekombinante hormonet var opphav til falske positive resultater ved fosfofargingen, ble rhEPO også forsøkt fosfofarget i gel. rhEPO skal, i følge litteraturen, ikke inneholde detekterbare mengder fosfat [78], og gav ingen signaler ved fosfofarging. To prøver med uhEPO-A, den ene spiket med rhEPO og den andre ikke, gav like bilder ved fremkalling i CCD-kameraet etter fosfofarging. Siden rhEPO har en noe høyere molekylmasse enn uhEPO, ville ulike bilder vært resultatet om noe på rhEPO gav opphav til signaler ved fosfofarging. Like bilder gav sikrere bevis for at fosfatgrupper detektert ved fosfofarging av uhEPO skyldes det endogene hormonet.

Mangel på fosfatpåvisning ved bruk av antistoff mot fosfat påhektet seringrupper og ved bruk av fosfatasen som spalter av fosfatgrupper koblet til serin, tyrosin og treonin, kan tyde på at fosfatgrupper ikke er koblet til uhEPOs proteinkjede. Det er også en mulighet at disse to metodene ikke har fungert som ønsket, for eksempel at fosfatasen ikke har virket og at anti-fosfoserin-antistoffet er brukt i feil mengde. Fosfofarging i gel viser likevel tydelig at uhEPO er fosforylert. Fosfofargingen fosfatgrupper på uhEPO er påvist med sies å detektere fosfogrupper koblet til peptider og proteiner. Det stilles likevel spørsmål ved at fosfatgrupper koblet til sukkerstrukturer eller andre strukturer ikke skal kunne detekteres ved hjelp av denne fluorescerende fargen. Det kan dermed ikke utelukkes at fosfatgrupper er koblet til uhEPOs sukkerstrukturer.

I tillegg til å bestemme hvor og hva ladningsforskjellene mellom de ulike formene for hEPO skyldes, er det også interessant å få klarhet i hvor i kroppen endringene skjer. hEPO renses fra

humant serum (shEPO) ble testet for å bestemme om proteinet er fosforylert allerede i blodet. Det ble testet shEPO fra samme pasient som uhEPO-B. I motsetning til uhEPO gav fosforylert shEPO ingen signaler etter fremkalling i CCD-kameraet. EPO i humant serum er dermed ikke fosforylert i like stor grad som EPO i human urin, og antakelig ikke i det hele tatt. Negativt ladde fosfatgrupper er altså noe av det som bidrar til ladningsforskjeller mellom uhEPO og shEPO. Dette støtter opp om teorien at fosfatgrupper kan fungere som merkelapper på EPO-molekylene som forteller kroppen at de skal skilles ut via nyrene. For andre glykoproteiner, for eksempel LH (luteiniserende hormon), har sulfaterte molekyler vist å ha en mye raskere utskillelse fra kroppen enn usulfatert hormon [30]. Det er mulig at fosfat har den samme effekten på EPO, og at de negativt ladde gruppene fungerer som merkelapper for nyreutskillelse på de ulike hormonene. Det er ikke utført noen forsøk for å påvise andre negativt ladde grupper enn fosfat på uhEPO i denne oppgaven. Det er selvsagt en mulighet at uhEPO både er fosforylert, sulfatert og karboksylert og at andre grupper enn disse igjen også bidrar til ladningsforskjellene som oppleves mellom uhEPO, shEPO og rhEPO. Videre studier må til for å finne svar på dette.

Det ble benyttet urin- og serumprøver fra anemipasienter i alle forsøkene hvor påvisning av fosfatgrupper var målet. Anemipasienter har veldig høye nivåer av erythropoietin, og det kan tenkes at hormonet føres gjennom glykosyleringsmaskineriet i cellen hurtigere enn vanlig. Derfor kan det ikke utelukkes at glykosyleringsmønsteret har endret seg noe i forhold til friske personer. Tidligere sammenlikninger gjort mellom shEPO og uhEPO fra samme pasient og viser uansett en reell endring i erythropoietins pI [72]. uhEPO-A og B benyttet i oppgaven viste videre et ladningsmønster ved IEF tilsvarende normale individer. Den alternative kilden benyttet, human urin standard, kommer fra friske individer, men er bearbeidet og frysetørret, noe som heller ikke kan utelukkes å gi endringer i erythropoietins glykosyleringsmønster. Det optimale ville vært å kunne undersøke urin direkte fra friske individer, men med de lave konsentrasjonene av erythropoietin i normal urin ville man trenge mer sensitive systemer enn det som er tilgjengelig i dag.

Når det gjelder EPO er det tidligere utført svært få undersøkelser på hva ladningsforskjellene mellom de ulike formene skyldes. Viktigheten av slike studier kan begrunnes både i dopingsammenheng og på et farmasøytisk grunnlag. Metoden som i dag benyttes for å avsløre rhEPO-misbruk hos idrettsutøvere er basert på ladningsforskjellene mellom uhEPO og rhEPO, til tross for at det er ukjent hva disse skyldes. Studier som avslører hva og hvor de

ekstra negative ladningene på uhEPO er lokalisert vil bidra til kunnskap om hva dopinganalysen faktisk er basert på, og dermed åpne mulighetene for forbedringer eller eventuelt utvikling av nye analysemetoder. Fra et farmasøytisk synspunkt er det ønskelig at et legemiddel er likest mulig det endogene stoffet det skal etterlikne effekten til. Dette er viktig for å unngå bivirkninger knyttet til strukturer som ikke foreligger naturlig i kroppen, og dessuten unngå mulige autoimmune reaksjoner på kroppsfrremmed hormon [48]. For å kunne produsere rekombinant EPO likest mulig det naturlige hormonet, må ytterligere kunnskap om ulikhetene mellom formene først tilegnes. Videre strukturopklaring av endogent EPO i kombinasjon med bestemmelse av hvor i kroppen og hvorfor ulikhetene til rhEPO oppstår, vil dessuten gi informasjon om erythropoietins farmakokinetikk. Dette vil kunne brukes til å designe EPO-analoger med ønsket effekt.

6 Konklusjon

Det ble vist at β -D-galaktosemolekylene i de N-bundne oligosakkaridstrukturene i uhEPO har negativt ladde grupper knyttet til seg, mens monosakkaridet bundet innenfor galaktoseenhetene, β -D-N-acetylglukosamin, ble vist ikke å ha negativt ladde grupper påkoblet. Sukkerstrukturen innenfor β -D-N-acetylglukosamin og inn til proteinkjeden ble også vist å bidra med negative ladninger til uhEPO. Det ble videre vist at uhEPO lettere N-deglykosyleres av N-glykanase enn rhEPO.

Ved sammenlikning av de totalt deglykosylerte formene av uhEPO og rhEPO, ble det vist at uhEPOs proteinskjelett har lavere pI enn rhEPOs proteinskjelett. De ekstra negative ladningene uhEPO har i forhold til det rekombinante hormonet er altså fordelt både på proteinet og på sukkerstrukturene.

uhEPO ble i oppgaven for første gang vist å være fosforylert. Metoden som ble brukt var 2D elektroforese og fosfofarging direkte i gelen. Det ble ikke funnet fosfatgrupper hos EPO fra humant serum. Forskjellen mellom uhEPO og shEPO fra samme individ gjør det er rimelig å anta at fosfatgruppene som detekteres på EPO fra human urin er ”merkelapper” for å vise kroppen at hormonet skal skilles ut via nyrene.

7 Referanseliste

1. Haug, E., K.I. Birkeland, and P. Hemmersbach, *Doping og idrettsutøvere*. Tidsskrift for den Norske Lægeforening, 1999. **119**(17): p. 2538-40.
2. Verroken, M., *Drug use and abuse in sport*. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2000. **14**(1): p. 1-23.
3. Berg, J.P. and P. Hemmersbach, *Dopingkontroll*. Genialt, 2003. **12**(4): p. 15-16.
4. Internettadresse, *Anti-Doping Norges hjemmeside* <http://www.anti-doping.no/t2.asp?p=46950> , sist besøkt 31.07.06.
5. Jelkmann, W., *Erythropoietin: structure, control of production, and function*. Physiol Rev, 1992. **72**(2): p. 449-89.
6. Benestad, H.B., *Blodcellenes fysiologi: Livsløp, funksjoner og regulering*. 2005.
7. Lasne, F. and J. de Ceaurriz, *Recombinant erythropoietin in urine*. Nature, 2000. **405**(6787): p. 635.
8. Spivak, J.L., *Erythropoietin use and abuse: When physiology and pharmacology collide*. Adv Exp Med Biol, 2001. **502**: p. 207-24.
9. Fisher, J.W., *Erythropoietin: physiology and pharmacology update*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(1): p. 1-14.
10. Spivak, J.L., *Erythropoietin: a brief review*. Nephron, 1989. **52**(4): p. 289-94.
11. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. Vol. 1. 2001: Gyldendal Norsk Forlag AS. 340-47.
12. D'Andrea, A.D., et al., *The cytoplasmic region of the erythropoietin receptor contains nonoverlapping positive and negative growth-regulatory domains*. Molecular and cellular biology, 1991. **11**(4): p. 1980-87.
13. Constantinescu, S.N., S. Ghaffari, and H.F. Lodish, *The Erythropoietin Receptor: Structure, activation and intracellular signal transduction*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 1999. **10**(1): p. 18-23.
14. Jelkmann, W., *Effects of Erythropoietin on brain function*. Curr Pharm Biotechnol, 2005. **6**: p. 65-79.
15. Scott, J. and G.C. Phillips, *Erythropoietin in sports: a new look at an old problem*. Curr Sports Med Rep, 2005. **4**(4): p. 224-6.

16. Lacombe, C. and P. Mayeux, *Biology of erythropoietin*. Haematologica, 1998. **83**(8): p. 724-32.
17. Jelkmann, W., *Use of recombinant human erythropoietin as an antianemic and performance enhancing drug*. Curr Pharm Biotechnol, 2000. **1**(1): p. 11-31.
18. Miyake, T., C.K. Kung, and E. Goldwasser, *Purification of human erythropoietin*. J Biol Chem, 1977. **252**(15): p. 5558-64.
19. Lin, F.K., et al., *Cloning and expression of the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(22): p. 7580-4.
20. Jacobs, K., et al., *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin*. Nature, 1985. **313**(6005): p. 806-10.
21. Nissen-Lie, G., et al., *Serum sTfR levels may indicate charge profiling of urinary r-hEPO in doping control*. Med Sci Sports Exerc, 2004. **36**(4): p. 588-93.
22. Pascual, J.A.B., BSc Bolos C Gutierrez, R, *Recombinant Erythropoietin and Analogues, A Challenge for Doping Control*. Ther drug Monit, 2004. **26**(2 (April 2004)): p. 175-179.
23. Fisher, J.W., *Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects*. Proc Soc Exp Biol Med, 1997. **216**(3): p. 358-69.
24. Romanowski, R.R. and A.J. Sytkowski, *The molecular structure of human erythropoietin*. Hematol Oncol Clin North Am, 1994. **8**(5): p. 885-94.
25. Fukuda, M.N., et al., *Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates*. Blood, 1989. **73**(1): p. 84-9.
26. Elliott, S., et al., *Isolation and characterization of conformation sensitive antierythropoietin monoclonal antibodies: effect of disulfide bonds and carbohydrate on recombinant human erythropoietin structure*. Blood, 1996. **87**(7): p. 2714-22.
27. Kamerling, J.P., *Carbohydrate features of recombinant human glycoproteins*. Biotechnologia Aplicada, 1996. **13**: p. 167-80.
28. Nelson, D.N. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third ed. 2000: Worth Publishers, New York, USA.
29. Hardy, *Methods for the analysis of glycoprotein carbohydrates*. 1994.
30. Lis, H. and N. Sharon, *Protein glycosylation. Structural and functional aspects*. Eur J Biochem, 1993. **218**(1): p. 1-27.
31. Skibeli, V., G. Nissen-Lie, and P. Torjesen, *Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3626-34.

-
32. Gates, R., et al., *Glycoprotein analysis manual*. 1 ed. 2004: Sigma-Aldrich.
 33. Egrie, J.C. and J.K. Browne, *Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP)*. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. **16 Suppl 3**: p. 3-13.
 34. Hokke, C.H., et al., *Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetyllactosamine units*. *Eur J Biochem*, 1995. **228**(3): p. 981-1008.
 35. Wide, L. and C. Bengtsson, *Molecular charge heterogeneity of human serum erythropoietin*. *Br J Haematol*, 1990. **76**(1): p. 121-7.
 36. Inoue, N., et al., *Structures of mucin-type sugar chains on human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells*. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **301**(2): p. 375-8.
 37. Jelkmann, W., *Molekylar Biology of Erythropoietin*. *Internal Medicine*, 2004. **43**(8): p. 649-59.
 38. Dordal, M.S., F.F. Wang, and E. Goldwasser, *The role of carbohydrate in erythropoietin action*. *Endocrinology*, 1985. **116**(6): p. 2293-9.
 39. Elliot, S., et al., *Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate*. *Experimental Hematology*, 2004. **32**: p. 1146-55.
 40. Jelkmann, W., *Erythropoietin*. *J. Endocrinol. Invest.*, 2003. **26**: p. 832-837.
 41. Jelkmann, W., *The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEPO and NESP*. *Eur J Haematol*, 2002. **69**: p. 265-274.
 42. Felleskatalogen AS, *Felleskatalogen 2006*. Vol. 48. 2006, Oslo.
 43. Macdougall, I.C., et al., *Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(11): p. 2392-5.
 44. Wide, L., et al., *Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men*. *Med Sci Sports Exerc*, 1995. **27**(11): p. 1569-76.
 45. Jelkmann, W. and T. Hellwig-Burgel, *Biology of erythropoietin*. *Adv Exp Med Biol*, 2001. **502**: p. 169-87.
 46. Adamson, J., *Erythropoietin, iron metabolism, and red blood cell production*. *Semin Hematol*, 1996. **33**(2 Suppl 2): p. 5-7; discussion 8-9.

-
47. *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell 2004*, ed. Foreningen for utgivelse av Norsk Legemiddelhåndbok. 2004, Oslo.
 48. Bunn, H.F., *Drug-induced autoimmune red-cell aplasia*. N Engl J Med, 2002. **346**(7): p. 522-3.
 49. Statens Legemiddelverk, *Terapianbefaling: G-CSF, GM-CSF og erythropoietin innen hematologi og onkologi*. 2001. **04**.
 50. Shaskey, D.J. and G.A. Green, *Sports haematology*. Sports Med, 2000. **29**(1): p. 27-38.
 51. Varlet-Marie, E., et al., *Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Recombinant Human Erythropoietins in Doping Control* Varlet-Marie and Gaudard have equally contributed to this work and should both be considered as first authors. Sports Med, 2003. **33**(4): p. 301-15.
 52. Ekblom, B. and B. Berglund, *Effect of erythropoietin administration on maximal aerobic power*. Scand J Med Sci Sports, 1991. **1**: p. 88-93.
 53. Birkeland, K.I., et al., *Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance*. Med Sci Sports Exerc, 2000. **32**(7): p. 1238-43.
 54. Jenkins, P., *Doping in sport*. Lancet, 2002. **360**(9327): p. 99-100.
 55. Ashenden, M.J., *A strategy to deter blood doping in sport*. Haematologica, 2002. **87**(3): p. 225-32.
 56. Cazzola, M., *A global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs*. Haematologica, 2000. **85**(6): p. 561-3.
 57. Wide, L., B. Wikström, and K. Eriksson, *A new principle suggested for detection of darbopoietin-alfa (NESP) doping*. Upsala J Med Sci, 2003. **108**: p. 229-38.
 58. Lasne, F., *Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures*. J Immunol Methods, 2001. **253**: p. 125-131.
 59. Souillard, A., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in athletes. Blood sampling and doping control*. Br J Clin Pharmacol, 1996. **42**(3): p. 355-64.
 60. Skibeli, V., et al., *Immuno-affinity extraction of erythropoietin from human serum by magnetic beads*. Recent advances in doping analysis:, ed. G.H. Schänzer W, Gotzmann A, Mareck-Engelke U. Vol. 6. 1998, Cologne: Sport & Buch Strauss. 313-329.

61. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
62. Internettadresse,
<http://www.davidson.edu/academic/biology/courses/Molbio/SDSPAGE/SDSPAGE.html>, sist besøkt 31.10 2006.
63. Hames, B.D., *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. third ed. Practical Approach Series, ed. B.D. Hames. 1998, Leeds: Oxford University Press.
64. Internettadresse, *Invitrogens hjemmeside*
<https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.viewProductDetails&productDescription=775> & , sist besøkt 26.10 2006.
65. Internettadresse, *Invitrogens hjemmeside*
<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=3468&CID=ILC-FRIENDLYURL&ATT=NUPAGE> , sist besøkt 31.10 2006.
66. Gorg, A., et al., *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems*. Electrophoresis, 1995. **16**(7): p. 1079-86.
67. Gorg, A., W. Postel, and S. Gunther, *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 1988. **9**(9): p. 531-46.
68. Invitrogen, *Instruksjonsmanual til XCell II™ Blot Module*. 2003.
69. Biotechnology, P., *Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide*. 2005.
70. Miura, K.T., T. Nagashima, M. Imai, C., *Application Note No. 7; Film Method and CCD Method for Chemiluminescence Detection*. 1998, Tokyo: Fuji Photo Film Co.
71. Nakajima, T.B., C, *Characterization of the Carbohydrate Fragments Obtained from Saccharomyces cerevisiae Mannan by Alkaline Degradation*. The Journal of Biological Chemistry, 1974. **249**(December 10): p. 7679-7684.
72. Nissen-Lie, G., et al., *Charge analyses of human erythropoietin and analogues*. Recent advances in doping analysis, ed. G.H. Schänzer W, Gotzmann A, Mareck-Engelke U. Vol. 10. 2002, Cologne: Sport & Buch Strauss. 145-157.
73. Imai, N., et al., *Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro*. Eur J Biochem, 1990. **194**(2): p. 457-62.
74. Hjerrild, M., *Proteomic analysis of Protein kinase A substrates and polo-like kinase 1 interactors using bioinformatics and mass spectrometry*, in *Department of clinical*

- biochemistry, Glostrup sykehus, Danmark*. 2006, Universitetet i København: København.
75. Nissen-Lie, G. and V. Skibeli, personlig meddelelse. 2006.
76. Internettadresse, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> , sist besøkt 31.10.06.
77. Kawasaki, N., et al., *Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin*. Glycobiology, 2001. **11**(12): p. 1043-9.
78. Nimtz, M., et al., *Identification and structural characterization of a mannose-6-phosphate containing oligomannosidic N-glycan from human erythropoietin secreted by recombinant BHK-21 cells*. FEBS Lett, 1995. **365**(2-3): p. 203-8.
79. Tam, R.C., et al., *Comparisons of human, rat and mouse erythropoietins by isoelectric focusing: differences between serum and urinary erythropoietins*. Br J Haematol, 1991. **79**(3): p. 504-11.

8 Vedlegg

VEDLEGG 1 Forkortelser og definisjoner

VEDLEGG 2 Utstyr og reagenser benyttet til analyser

Vedlegg 1 Forkortelser og definisjoner

2D	Todimensjonal
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
BSA	Bovint serumalbumin
CCD	Charge coupled devise
CHO	Chinese hamster ovary
CSF	Colony stimulating factor
Cys	Cystein
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Etylendiamintetracetat
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietinreseptoren
ER	Endoplasmatisk retikulum
EQ-buffer	Equilibreringsbuffer
Fuc	α -L-Fucose
Gal	β -D-galaktose
GH	Growth hormone (veksthormon)
GlcNAc	β -D-N-acetylglukosamin
Hematokrit	Volumfraksjonen av røde blodlegemer i forhold til det totale blodvolumet
hEPO	Humant erythropoietin
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α
HRP	Horse-radish peroxidase (pepperrot peroksidase)
IAA	Iodoacetamid
IEF	Isoelektrisk fokusering
IOC	Den Internasjonale Olympiske Komité
IE	Internasjonal enhet
IgG	Immunoglobulin G
IPG	Immobilisert pH-gradient
JAK2	Janus kinase 2
kDa	KiloDalton
LDS	Litium dodecyl sulphat
LH	Luteiniserende hormon

mA	Milliampère
Man	β -D-mannose
NESP	New erythropoiesis-stimulating protein (=Darboepoietin α)
NeuNAc	α -N-acetylneuraminsyre (sialinsyre)
NIF	Norges idrettsforbund og Olympiske komité
NL	Nonlineær
OL	Olympiske leker
PAGE	Polyakrylamid gelelektroforese
PBS	Fosfatbufret saltvann
pI	Isoelektrisk punkt, pHen hvor et molekyl har nettoladning lik null
PI3-K	Fosfatidyl-inositol 3-kinase
PVDF	Polyvinyl difluorid
RH-buffer	Rehydreringsbuffer
rhEPO	Rekombinant humant erytropoietin
RPM	Rotasjon per minutt
SDS	Sodium dodecyl sulfat
Ser	Serin
SH2	Src homologi 2
shEPO	Erytropoietin fra humant serum
shEPO-B	Humant serum erytropoietin fra anemipasient B
STAT5	Signal transducer and activator of transcription
TEMED	N',N',N',N'-tetrametyletylendiamin
Tris-HCl	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin hydroklorid
uhEPO	Erytropoietin fra human urin
uhEPO-A	Human urin erytropoietin fra anemipasient A
uhEPO-B	Human urin erytropoietin fra anemipasient B
V	Volt
Vh	Volttimer
VO _{2max}	Maksimalt oksygenopptak
V _{max}	Maksimal spenning (V)
W	Watt
WADA	World Anti Doping Agency
λ -PPase	Lambda Protein Fosfatase

Vedlegg 2 Reagenser, apparatur og oppskrifter

Reagenser:

β -Galactosidase fra E. coli	Roche
β (1-4)Galactosidase fra Streptococcus pneumoniae og tilhørende reaksjonsbuffer	Prozyme
β -N-acetyl-hexosaminidase, rekombinant, og tilhørende reaksjonsbuffer	Sigma
40 % w/v akrylamidløsning med 3 % w/w bisakrylamid	Amersham Biosciences
Agarose	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS), 10 %	Sigma
Bovint serumalbumin	Sigma
Bromofenolblå (BFB)	Riedel-de Haën
Centricon Plus-20	Millipore
Centricon YM-30	Millipore
CHAPS	Pierce
Chemiluminiscent peroksidasesubstrat	Sigma
Complete™ (proteasehemmer-coctail)	Roche
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DryStrip Cover Fluid	Pharmacia
Durapore membranfilter	Millipore
Eddiksyre	VWR
EDTA	Merck
Elektrodepapir novablot (filterpapir)	Amersham Biosciences
Elektrodepapirbiter	BioRad
Elektrodestrips	Amersham Biosciences
Endo- α -N-acetylgalactosaminidase, rekombinant (= O-glykosidase)	Calbiochem
Falconrør	Millipore
Fosforysyre (ortho) 85%	Merck

Gelbond	Amersham Biosciences
Glyserol (87 % v/v)	Calbiochem
Glycin	Sigma
uhEPO-standard, frysetørret	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)
Iodoacetamide (IAA)	Sigma
Immobiline TM Dry Strip pH 3-5,6 NL, 7 cm	GE Healthcare
Immobiline TM Dry Strip pH 3-10 NL, 7 cm	GE Healthcare
Lambda Protein Fosfatase (λ -PPase) og tilhørende reaksjonsbuffer	Sigma
Low Molecular Weight Standard, biotinylert	BioRad
Metanol	VWR
Metylrød	BDH
MilliQ-vann	Millipore
Monoklonalt antistoff (mus α hEPO), klon AE7A5	R&D Systems
Natriumacetat	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
N-glycosidase F (PNGase)	Sigma
Natriumhydroksid	Merck
NESP (darboepoietin α)	Amgen
NuPAGE TM Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE TM LDS Sample Buffer	Invitrogen
NuPAGE TM MES SDS Running Buffer	Invitrogen
NuPAGE TM MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen
NuPAGE TM Novex 4-12 % Bis-Tris Gel, 1.0mm x 10 well	Invitrogen
NuPAGE TM Novex 12 % Bis-Tris Gel, 1.0mm x 10 well	Invitrogen
NuPAGE TM Novex 4-12 % Bis-Tris ZOOM TM Gel, 1.0mm x IPG well	Invitrogen
NuPAGE TM Sample Reducing Agent	Invitrogen
NuPAGE TM Transfer Buffer	Invitrogen
PBS-tabletter	Nerlien Kemiske, Oxoid

Pharmalytes 3-10 (amfolytter)	Pharmacia
Polyklonalt antistoff (kanin anti mus IgG)	Sigma
Polyklonalt antistoff (kanin α fosfoferin)	Invitrogen
Polyklonalt antistoff (geit anti kanin IgG)	Sigma
Precision Plus prestained proteinstandard, dual color	BioRad
Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain og Destain	Invitrogen
PVDF membran	Millipore
ReadyStrip™ IPG Strips 11 cm, pH 3-6	BioRad
rhEPO standard (Biological reference preparation)	European Pharmacopoeia Commission
Rulle	Amersham Biosciences
Saltsyre	VWR
SDS	Sigma
Servalyte pH 2-4	Serva
Servalyte pH 4-6	Serva
Servalyte pH 6-8	Serva
Sialidase fra Arthrobacter ureafaciens	Prozyme
Sialidase fra Newcastle disease virus	Prozyme
Sialidase V fra Vibrio cholerae og tilhørende reaksjonsbuffer	Prozyme
Steriflip	Millipore
Streptavidin HRP	Biospa
Sukrose	Sigma
TEMED	Merck
Thiourea	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ (Tris)	Merck
Tris-HCl	Merck
Tween 20	Merck
Tween 80	Pierce
Tørrmelk (skummetmelkpulver)	Nestlé
Urea	Amersham Biosciences

Apparatur:

Aida Version 2.43 (programvare)	Raytest
Biorad Protean IEF Cell	Biorad
Fuji LAS1000 plus (CCD-kamera)	Fujifilm
LAS1000Lite (programvare)	Fujifilm
Multifuge 3 S-R	Heraeus Sepatech
Multiphor™ II og Multitemp™ III	Amersham Pharmacia Biotech
Nova Blot elektroblotter	Amersham Pharmacia Biotech
Semi Dry Multi Gel Electrophoretic Transfer (modell B)	Ancos
Sorvall RC5B GSA rotor	DuPont Company
Sorvall RC 3C Plus	DuPont Company
XCell SureLock™ Mini-Cell med XCell II™ Blot Module	Invitrogen

Oppskrifter:

Rehydreringsbuffer (RH-buffer):

Urea	4,20 g (7M)
Thiourea	1,52 g (2M)
CHAPS	400 mg
<u>MilliQ</u>	<u>til 10ml</u>
Pharmalytes 3-10	20 µl
BFB	noen korn

Tilsettes DTT rett før bruk, 7 mg / 2,5 ml.

TRIS-HCl med pH 8,8:

1,5 M Tris (FW 121,1)	36,34 g
MilliQ	ca 100ml
HCl	juster pH til 8,8
MilliQ	til 200ml

Equilibreringsbuffer (EQ-buffer):

	<u>Mengde</u>	<u>Sluttkonsentrasjon</u>
TRIS-HCl pH 8,8	10 ml	50 mM
Urea	72,07 g	6 M
Glycerol (87% v/v)	69 ml	30 % (v/v)
SDS	4,0 g	2 % (v/v)
BFB	noen korn	
MilliQ	til 200 ml	

Tilsettes DTT eller iodoacetamid rett før bruk.

50 mg DTT tilsettes 5ml EQ-buffer.

Ferdige rør IAA fra Sigma (ca 56mg) tilsettes 2,5 ml EQ-buffer.

0,5 % Agarose med BFB:

Agarose	100 mg
Elektroforesebuffer MES/MOPS	20 ml
BFB	noen korn

Blandingen må varmes kraftig opp for at agarosen skal løse seg.

IEF-gelens sammensetning:

Urea	15 g
Sukrose	1,74 g
Milli-Q	15,6 ml
Servalyte pH 2-4	1,9 ml
Servalyte pH 4-6	1,9 ml
<u>Akrylamid (30 %, 97/3 w/w)</u>	<u>4,7 ml</u>
10 % APS	310 µl
TEMED	31 µl

Avgasses 15 minutter (vannsug) med røring. APS og TEMED tilsettes rett før gelen støpes, 24,5 cm lang. Etter en times polymerisering legges gelen i et fuktig kammer for videre polymerisering i romtemperatur over natt.

Katodebuffer: 2 % Servalyte 6-8

Anodebuffer: 0,5 M fosforysre (H_3PO_4)

Blottebuffer 1:

NuPage Transferbuffer 20 x	50 ml
Metanol	200 ml
Milli-Q	til 1 L

Tilsettes NuPage antioksidant, 1 µl per ml blottebuffer, før bruk.

Blottebuffer 2:

25 mM Tris	6,06 g
192 mM Glycin	28,83 g
Milli-Q	til 2 L